

Vliv malolaktické fermentace na antioxidační aktivitu vína

Bc. Jana Hanáková

Diplomová práce
2011/2012



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie a mikrobiologie potravin
akademický rok: 2011/2012

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Jana HANÁKOVÁ**
Osobní číslo: **T10398**
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**

Téma práce: **Vliv malolaktické fermentace na antioxidační aktivitu vína**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Popište výrobu vína se zaměřením na malolaktickou fermentaci.
2. Charakterizujte chemické složení hroznového vína se zaměřením na jeho hlavní antioxidanty.
3. Udělejte literární rešerži metod stanovení antioxidační aktivity u hroznového vína.

II. Praktická část

1. Analyzujte a určete antioxidační aktivitu u definovaných vzorků vín.
2. Získaná data porovnejte s literaturou a výsledky vhodně okomentujte.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

[1] ROP, Otakar a Jan HRABĚ. Nealkoholické a alkoholické nápoje. 1. vyd. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2009, 129 s. ISBN 978-80-7318-588-6.

[2] ROP, OTAKAR, TUNDE JURIKOVA, JIRI SOCHOR, JIRI MLCEK a DANIELA KRAMAROVA. ANTIOXIDANT CAPACITY, SCAVENGING RADICAL ACTIVITY AND SELECTED CHEMICAL COMPOSITION OF NATIVE APPLE CULTIVARS FROM CENTRAL EUROPE. Journal of Food Quality. 2011, 34(3), 187-194. ISSN 01469428.

[3] GUILFORD, J. M. a J. M. PEZZUTO. Wine and Health: A Review. American Journal of Enology and Viticulture. 2011, 62(4), 471-486. ISSN 00029254.

[4] GARCÍA-RUIZ, A., B. BARTOLOMÉ, A.J. MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, E. PUEYO, P.J. MARTÍN-ÁLVAREZ a M.V. MORENO-ARRIBAS. Potential of phenolic compounds for controlling lactic acid bacteria growth in wine. Food Control. 2008, 19(9), 835-841. ISSN 09567135.

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Pavel Hanuštiak

Ústav technologie a mikrobiologie potravin

Datum zadání diplomové práce:

1. února 2012

Termín odevzdání diplomové práce:

2. května 2012

Ve Zlíně dne 10. února 2012


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: Hanáková Jana

Obor: THEVP

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 15. 10. 12

Bc. Jana Hanáková

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacího zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpirá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá vlivem malolaktické fermentace na antioxidační aktivitu vína. V teoretické části byla popsána technologie výroby vína, chemické složení a metody stanovení celkového obsahu polyfenolů a antioxidační aktivity. V praktické části jsou vyhodnoceny údaje o celkových polyfenolech a antioxidantech získané z laboratorní analýzy. Tyto údaje jsou dále zpracovány do přehledných grafů a konfrontovány s odbornou literaturou.

Klíčová slova: malolaktická fermentace, víno, polyfenoly, antioxidanty, chemické složení

ABSTRACT

This thesis deals with the influence of malolactic fermentation on the antioxidant activity of grape wine. In the theoretical part is described technology of wine production, chemical composition and methods used for determination of total polyphenol content and antioxidant activity. In the practical part are evaluated data of total polyphenol content and antioxidant activity obtained from laboratory analysis. These data are further processed in charts and confronted with technical literature.

Keywords: malolactic fermentation, wine, polyphenols, antioxidants, chemical composition

Chtěla bych poděkovat svému vedoucímu práce, Ing. Pavlu Hanuštiakovi, za odborné vedení, cenné rady, diskuse a připomínky během zpracování mé diplomové práce.

Prohlašuji, že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD	11
I TEORETICKÁ ČÁST	12
1 TECHNOLOGIE VÝROBY VÍNA	13
1.1 DRCENÍ HROZNŮ A PŘÍPRAVA RMUTU	14
1.2 LISOVÁNÍ RMUTU	15
1.3 ÚPRAVA MOŠTU PŘED KVAŠENÍM	16
1.4 KVAŠENÍ MOŠTU.....	18
1.5 ŠKOLENÍ VÍNA	19
1.6 LAHVOVÁNÍ A EXPEDICE	22
1.7 MALOLAKTICKÁ FERMENTACE	22
1.7.1 Chemické reakce během BOK	24
1.7.2 Bakterie kyseliny mléčné	24
1.7.3 Podmínky BOK	25
2 CHEMICKÉ SLOŽENÍ	27
2.1 SLOŽENÍ HROZNŮ	27
2.2 SLOŽENÍ MOŠTU.....	29
2.2.1 Voda	29
2.2.2 Sacharidy	29
2.2.3 Kyseliny.....	30
2.2.4 Minerální látky (popeloviny).....	31
2.2.5 Dusíkaté sloučeniny	32
2.2.6 Aromatické látky	32
2.2.7 Polyfenoly	32
2.3 SLOŽENÍ VÍNA.....	33
2.3.1 Voda	33
2.3.2 Alkoholy.....	33
2.3.3 Sacharidy	34
2.3.4 Kyseliny.....	35
2.3.5 Minerální látky (popeloviny).....	35
2.3.6 Dusíkaté sloučeniny	36
2.3.7 Bílkoviny	36
2.3.8 Aromatické látky	36
2.3.9 Vitaminy.....	36
2.3.10 Polyfenoly	37
2.4 ANTIOXIDANTY	37
2.4.1 Antioxidanty vína	38
2.4.2 Francouzský paradox.....	42
3 STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY	43
3.1 CHEMICKÉ METODY.....	44
3.1.1 Metoda TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity).....	44

3.1.2	Metoda ABTS	45
3.1.3	Metoda FRAP (ferric reducing ability of plasma).....	46
3.1.4	Metoda DPPH	47
3.1.5	Metoda používající galvinoxyl.....	48
3.1.6	Metoda ORAC (oxygen radical absorbance capacity)	48
3.1.7	Cyklická voltametrie	49
3.1.8	Metoda DCI (2,6-dichlorfenolindofenolová) - metoda MEBAK.....	49
3.1.9	Stanovení redukční síly 2,2'-bipyridylem.....	50
3.1.10	Stanovení celkového antioxidačního stavu	50
3.1.11	Metoda spoluoxidace β -karotenu v linoleátovém modelovém systému	50
3.1.12	Inhibice lipoxygenasové aktivity.....	50
3.2	FYZIKÁLNÍ METODY.....	51
3.2.1	Elektronová spinová rezonance (ESR).....	51
3.2.2	Stanovení redox potenciálu	51
3.2.3	Chemiluminiscence	51
3.2.4	Speciální metody	52
4	STANOVENÍ CELKOVÉHO OBSAHU POLYFENOLŮ	53
4.1	METODA FCM	53
4.2	METODA PBM	53
5	CÍL PRÁCE	54
II	PRAKTICKÁ ČÁST	55
6	MATERIÁL A METODIKA PRÁCE.....	56
6.1	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE	56
6.2	PŘÍSTROJE A POMŮCKY.....	56
6.3	ANALYZOVANÝ MATERIÁL	57
6.3.1	Úprava vzorků před stanovením	59
6.4	METODIKA	60
6.4.1	Příprava standardů.....	60
6.4.2	Metoda FCM	60
6.4.3	Metoda DPPH	61
7	VÝSLEDKY A DISKUSE	63
7.1	CELKOVÝ OBSAH POLYFENOLŮ	63
7.1.1	Metoda FCM	63
7.2	ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITA.....	67
7.2.1	Metoda DPPH	67
7.3	DISKUSE.....	71
	ZÁVĚR	73
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	75
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	83
	SEZNAM OBRÁZKŮ	84
	SEZNAM TABULEK.....	85

SEZNAM PŘÍLOH.....	86
---------------------------	-----------

ÚVOD

Četné epidemiologické práce posledních desetiletí svědčí o tom, že pravidelná a střídá konzumace vína byla spojena se zdravotními přínosy. Příznivé výsledky studií vlivu umírněného podávání alkoholu, respektive pití vína, vyvolaly zájem o další účinky vína na lidský organismus. Klinické studie a práce prováděné se zvířaty naznačují, že víno může chránit proti kardiovaskulárním onemocněním, ateroskleróze atd. Mechanismus účinku byl přičítán antioxidantům.

Víno se zařazuje mezi nápoje, v nichž se vyskytuje velké množství látek prospěšných našemu zdraví.

Nadměrná konzumace alkoholu je však zdraví nesmírně škodlivá. Způsobuje nemoci zažívacího ústrojí a celkovou postupnou devastaci organismu.

V malém množství však může víno působit opravdu prospěšně. Velmi známý je blahodárny vliv vína zejména na srdeční onemocnění. Významné jsou jeho antimikrobiální účinky, způsobené spojením alkoholu a fenolických látek, které jsou obsaženy ve víně. Fenolické látky působí pozitivně proti bakteriím a plísním. Víno pomáhá rovněž proti virovým onemocněním zažívacího traktu.

Přes jednoznačný názor, že pití malého množství jakéhokoliv alkoholu, ale především vína, má příznivý dopad na vznik a rozvoj aterosklerózy, a tím i na srdeční infarkt a mozkovou mrtvici, zůstává stále otevřena otázka, jestli je skutečně pití červeného vína prospěšnější než pití vína bílého. Bílé víno na rozdíl od červeného má pouze minimální množství polyfenolů a jeho antioxidační kapacita je ve srovnání s červeným vínem velmi nízká. Antioxidantů epikatechinu a kvercetinů je v červeném víně desetkrát více než v bílém.

Tato práce se zabývá sledováním vlivu malolaktické fermentace na antioxidační aktivitu vína. V teoretické části je popsána technologie výroby vína se zaměřením na malolaktickou fermentaci, která se využívá především při technologii výroby červených vín v našich klimatických podmínkách. Dále je zde také chemické složení hroznů, moštu i vína, antioxidanty jsou stručně charakterizovány a rozděleny do skupin. Najdete tu i metody stanovení antioxidační aktivity a celkového obsahu polyfenolů. V praktické části jsou pomocí vybraných metod stanoveny a vyhodnoceny údaje o celkových polyfenolech a antioxidantech získané z laboratorní analýzy.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 TECHNOLOGIE VÝROBY VÍNA

Výroba vína patří k nejstarším lidským činnostem [1]. Archeologické nálezy ji dokládají již před 7 500 lety [2]. Historie se vyvíjela od dávnověkých obyvatel Mezopotámie a starého Egypta přes antiku Řecka a Říma a středověk Evropy až k dnešním dnům [3]. Na našem území se provozovala již skoro před dvěma tisíci lety [1]. K rozšíření vinařství v široké míře však došlo až za vlády Karla IV. V minulosti opředená řadou bájí, pověstí a pověr se výroba vína vyvinula v moderní potravinářské odvětví s převládající velkovýrobou, ač nemalý podíl vína stále připadá i na malovýrobu [3].

Technologie výroby vína je závislá na tom, z jakých hroznů ho vyrábíme a jaký má být hotový výrobek. Proto postupujeme podstatně jinak při výrobě bílého vína než při výrobě červeného [4].

Bílé víno vyrábíme ze žlutých, růžových a červených hroznů. Pro jeho výrobu jsou nejvhodnější moštové odrůdy. Stolní odrůdy zpracováváme na víno jen výjimečně, a to zejména jsou-li hrozny poškozené, nahnílé a nevhledné. Pro výrobu kvalitního červeného vína je potřeba modrých odrůd. Červené víno se od bílého liší nejen barvou, ale i větším obsahem tříslovin, které příznivě působí na zdraví [4].

V technologii výroby červeného vína hraje významnou roli „fenolická zralost hroznů“. Barvu červených vín tvoří antokyany a chuť červených vín vzniká nejen na základě obsahu a složení taninů, ale i kyselin a alkoholu. Významné pro kvalitu červených vín jsou veškeré fenolické látky, které jsou mnohem důležitější nežli aromatické látky; u bílých vín je tomu naopak [2].

Výroba vína zahrnuje tyto technologické postupy [5]:

1. drcení hroznů a příprava rmutu,
2. lisování rmutu,
3. úprava moštu pro kvašení,
4. kvašení moštu,
5. školení vína,
6. lahvování a expedice.

1.1 Drcení hroznů a příprava rmutu

Před lisováním je třeba pro snadnější uvolnění šťávy z bobulí hrozny rozemlít tak, aby byly odděleny třapiny od bobulí a ty narušeny, čímž vznikne rmut [4]. Drcením se usnadní lisování, zvýší se vylisnost a zabrání se zapaření. Při drcení má každá bobule prasknout, nesmějí se ale poškodit pecičky, třapina a slupky. Z těchto částí by se mohly do moštu totiž vyluhovat nežádoucí látky, jako oleje a chlorofyl [5]. Tyto složky zhoršují kvalitu budoucího vína. Vytvářejí nepříjemnou travnatou příchut' [4]. Nejpoužívanějším typem drtičů u nás jsou mlýnky kombinované s odzrňovacím žlabem a pístovým čerpadlem [5].

Rmut se dále zpracovává následovně [5]:

- pro výrobu bílých vín se rmut okamžitě lisuje,
- při výrobě z aromatických odrůd (např. Rulandské, Tramín apod.) se provádí nakvášení po dobu asi 6 hodin. Účelem je vyluhování aromatických látek ze slupek a rozložení pektinu, a tím zvýšení vylisnosti,
- při výrobě červených vín se rmut z modrých hroznů musí nechat nakvášet pro vyluhování tříslovin a antokyanových barviv.

Pro nakvášení mají být hrozny bezpodmínečně odzrněné a zdravé. Při teplém počasí nakvašujeme 6 hodin, při chladném 15 - 20 hodin a při velmi chladném i déle. Nakvášení rmutů s nízkým obsahem kyselin je nežádoucí a má za následek fádňní vína [4].

Nakvášení se může kombinovat s ošetřením rmutu pektolytickými enzymy pro usnadnění lisování, zvýšení výtěžnosti moštu a zlepšení filtrovanosti vína. Dále pak i pro zlepšení vůně a barevnosti moštu i vína [4].

Nakvášení má i některé nevýhody spočívající v tom, že budoucí víno může mít vyšší obsah tříslovin, zejména u běžných odrůd. Proto je výhodnější nechat hrozny dobře vyžrát, čímž se vytvoří i dostatečné množství buketních látek [4].

Způsoby nakvášení rmutu pro výrobu červených vín

Doba vyluhování závisí na vyžrállosti hroznů, jejich zdravotním stavu a dále na nakvašovací teplotě. Po určité době se vlivem osmotických tlaků vyrovnají koncentrace barviv v slupce a v kvasícím moštu. Nakvašování při teplotě 15 °C nemá trvat déle než

několik hodin. Příliš dlouhým nakvácením získá víno nepříjemnou chuť, nepřírodně hnědou barvu a dochází k octovému kvašení. [5].

Vznikající oxid uhličitý vynáší na povrch nečistoty, které tvoří pevnou vrstvu, tzv. klobouk. Stykem se vzduchem probíhá na povrchu klobouku octové kvašení a navíc v částech, kde je klobouk nad povrchem kvasícího moštu, nedochází k vyluhování barviv - proto se musí klobouk v pravidelných intervalech do kvasícího rmutu nořit [5]. Podle způsobu ponořování klobouku do rmutu známe tyto způsoby nakvašování [4, 5, 6]:

1. nakvašování v otevřených nádobách s volně plujícím kloboukem,
2. kvašení v otevřených nádobách s ponořeným kloboukem,
3. kvašení v uzavřených nádobách s ponořeným kloboukem,
4. vyluhování barviv horkým moštem,
5. kvašení přes čtyři.

Po úspěšném ukončení nakvácení se většinou provede jablečno-mléčné kvašení. Zkušeni vinaři mohou tento technologický krok provádět současně s alkoholovým kvašením. Malovinařům nebo začínajícím vinařům se doporučuje s ním započít až po ukončení alkoholového kvašení [2].

1.2 Lisování rmutu

Drť nebo scezený rmut je co nejrychleji, pokud možno ihned po naležení, vylisován [4].

Lisováním se odděluje mošt od tuhých částí rmutu. Intenzitu lisování ovlivňuje konstrukce lisu, použitý tlak, mechanické vlastnosti rmutu aj. Důležitý je také stupeň zralosti hroznů a odrůda. Dále i to, zda je rmut odzrněný či nikoliv. Rychlost lisování závisí na typu lisů, způsobu lisování, ošetření rmutu před lisováním apod. [4].

Dnes se nejčastěji používají komorové nebo kontinuální šnekové lisy. Rmut se nedoporučuje lisovat vyšším měrným tlakem než 1,6 MPa. Lisování musí být pozvolné a přerušované, aby mošt plynule odtékal. Po prvním lisování se matoliny (výlisky) rozdrobí a lisuje se zpravidla podruhé. Výlisnost hroznů se pohybuje okolo 70 – 75 % podle odrůdy a kvality hroznů [5].

Postup práce by měl být takový, že na začátku lisování se použije u všech typů lisů nízký tlak. Potom je tlak zvyšován a v určitých intervalech se přerušuje. Zvyšuje-li se od počátku i v průběhu lisování prudce tlak, zmenšuje se tím výkon lisu, protože se ucpávají jemné odtokové póry. Odpor v lisovací soustavě se zvyšuje a rmut je dostatečně nevylišován [4].

Předpokládá se, že z celkového vylisovaného množství moštu bývá 60 % samotoku (scezeného moštu), který obsahuje nejvíce cukru a buketních látek. Dále je 26 % moštu z prvního lisování, pocházejícího převážně z dužniny a slupek, který obsahuje ještě dost cukru, méně kyselin i tříslovin. Dalších 10 % moštu je z druhého lisování. Tento mošt pochází ze slupek a stopek, takže obsahuje málo cukru, ale hodně tříslovin, dusíkatých látek a barviva. Poslední 4% moštu ze třetího lisování obsahují velmi málo cukru, ale hodně tříslovin a barviva [4, 5].

Při lisování je velmi důležité u všech typů lisů, aby nebyla zbytečně zvyšována výlisnost neúměrně vysokým tlakem na konci procesu této operace. Je nutno si uvědomit, že cílem lisování není získání co největšího množství moštu bez ohledu na jeho kvalitu, ale optimální množství kvalitního moštu. Kvalita se odrazí nejen v chuťových vlastnostech budoucího vína, ale i v jeho dalším zpracování [4].

1.3 Úprava moštu před kvašením

Odkalení patří k nejdůležitějším postupům, jak získat čisté víno bez postranních tónů ve vůni a chuti [6].

Mošt získaný lisováním je kalný, neboť obsahuje nepatrné úlomky slupek a dužniny [7]. Velmi nežádoucí je, když se mezi kalovými částicemi nachází i mikrobiální organismy (plísňe, bakterie, kvasinky) a rezidua přípravků na ochranu rostlin (v případě nedodržení ochranné lhůty pro jejich aplikaci) [2]. Alkohol vznikající při kvašení by vyluhoval z kalických částic nežádoucí látky a snížila by se jemnost vína, proto je třeba kalící částice z moštu odstranit [7]. Odkalení se může uskutečnit diskontinuálně nebo kontinuálně [6].

Malé množství moštu se může odkalit jeho zchlazením po dobu 12 - 14 hodin na 5 - 10 °C v chladném sklepě nebo v chladicím zařízení. Za tuto dobu se kaly usadí a čistý mošt je potom stáhnut do kvasných nádob [4].

Na rozdíl od ovocných vín je zakázáno upravovat révový mošt vodou nebo vodnými cukernými roztoky. K základním úpravám moštu před kvašením patří [5]:

- úprava cukernatosti,
- síření moštu,
- úprava kyselin v moštu.

Pro harmonickou chuť vína je rozhodující zejména obsah etanolu a kyselin ve víně. Docukření zvyšuje v konečné fázi obsah etanolu. Docukřovat je povoleno pouze zahuštěným moštem nebo cukrem, který je za studena rozpuštěn v přiměřeném obsahu moštu. Docukřit se má do 72 hodin po vylisování. Pozdější docukření nakvašeného moštu zvyšuje dobu kvašení a víno se pomaleji čistí. Při výrobě červených vín se může cukr přidávat před nakvašováním rmutu [5]. Pro zvýšení cukernatosti o 1 °NM je potřeba přidat 1,05 kg cukru. Docukřením o každý přidávaný kg cukru se objem moštu současně zvýší o 0,66 litru. U jakostních révových vín s přívlastkem je docukřování zakázáno [2, 4, 5, 6, 7].

Oxid siřičitý působí v mošttech redukčně a konzervačně. Ve vhodných dávkách působí příznivě na tvorbu buketu i chuťových vlastností budoucího vína a ovlivňuje jakost a stabilitu [4].

Sířením se chrání mošt před oxidací a infekčními mikroorganismy. Zároveň se podporuje tvorba glycerolu při kvašení [5]. Zdravé mošty se síří na koncentraci 20 - 40 mg SO₂ v litru, a to sirnými knoty nebo K₂S₂O₅. U moštů z nahnilých hroznů je možno tuto koncentraci oxidu siřičitého zvýšit [4, 5]. Po zasíření červených moštů se antokyanová barviva sice mírně odbarví, ale zabrání se pozdější oxidaci, takže vína mají intenzivnější červenou barvu [5].

Velmi vysoké koncentrace obsahu oxidu siřičitého ve víně mohou negativně ovlivnit především aromatický a chuťový projev vína. Tuto vadu lze označit jako „přesíření“ neboli „přesířené víno“ [2, 8]. Stále se musí mít na paměti, že oxid siřičitý je považovaný ve vinařství za cizorodou látku, která může mít nepříznivý účinek na lidský organismus, proto je používán jen v nezbytném množství [4].

Ve velmi nepříznivých ročnících se může v moštu vyskytovat i nadměrný obsah kyselin [7]. Pokud kyseliny v moštu přesáhnou hranici 12 g/l, používá se ke snížení jejich obsahu uhličitán vápenatý. Při odkyselování se odebírá jen tvrdší kyselina vinná [2, 7]. Druhým

způsobem snížení kyselin v moštu je scelení moštu kyselého s moštem méně kyselým. Úprava musí být provedena pouze v rámci jedné odrůdy [2, 4].

Při zrání révových bobulí dochází ke snižování obsahu kyselin jejich dodýcháváním. Rychleji se prodýchává kyselina jablečná a ve vinařských státech jižní polokoule se může úplně rozložit. Kyselost moštu se pohybuje od 0,6 - 0,8 %, v nepříznivých letech až do 1,6 % [5].

V průměrných vegetačních letech obsahují naše mošty z révy vinné přiměřenou koncentraci kyselin a kyselost není nutné upravovat [5].

1.4 Kvašení moštu

Vylisovaný mošt se ponechá samovolně kvasit v sudech, pochází-li ze zdravých a čistých hroznů, a pokud nebyly do moštu udělány žádné zásahy, které by mohly ovlivnit jeho přirozenou mikroflóru, která se do moštu dostala z hroznů v průběhu lisování. Nebo se použijí k zakvašení čisté kultury vinných kvasinek [4].

Alkoholové kvašení je složitý biochemický proces rozkladu cukru obsaženého v moště na alkohol a oxid uhličitý způsobený kvasinkami [2, 5, 7]. Alkoholové kvašení probíhá podle následující rovnice [2, 6]:



Ve vinařské praxi se rozlišují tyto postupy kvašení moštů [2]:

- spontánní kvašení,
- řízené kvašení.

Vzniklý alkohol (etanol) působí ve vyšších koncentracích konzervačně a prodlužuje údržnost vína, jinak je důležitou součástí chuti vína a vůně vína [5]. Souběžně s tvorbou alkoholu vznikají v průběhu kvašení vedlejší produkty, jako jsou glycerol, kyselina mléčná, octová a vyšší alkoholy [2, 5]. Metanol vzniká ve víně rozkladem pektinů, jeho množství je však zanedbatelné a pohybuje se max. do výše 0,45 % objemových u červených vín, u bílých vín je jeho obsah podstatně menší [5].

Kvasinky nejlépe pracují při 20 - 30 °C. Vhodnější je však vést kvasný proces při teplotách do 20 °C, kdy nedochází k vytékání buketních látek z vína [5].

Kvašení moštů probíhá v několika zřetelných fázích [2, 4, 7]:

1. počáteční – spouštěcí fáze,
2. rozmnožovací fáze,
3. fáze hlavního kvašení,
4. fáze odumírání kvasinek.

1.5 Školení vína

Nejlepší vlastnosti získává víno v průběhu zrání (školení) za nejvhodnějších podmínek [5]. V průběhu školení je důležité pravidelné dolévání [5, 7]. Školené víno se nesmí dolévat vínem neškoleným. Teplota zrání nesmí kolísat v závislosti na ročním období. Pro zrání vína se doporučují následující teploty [5]:

- pro přírodní bílá vína 8 až 10 °C,
- pro červená vína 10 až 12 °C,
- pro těžká, extraktivní a dezertní vína 12 až 14 °C.

Nižší teploty mohou zpomalovat vyzrávání vína, vyšší mohou naproti tomu negativně poškozovat kvalitu vína, a to až po vznik chorob a vad ve víně [2].

Relativní vlhkost je vhodné udržovat v rozmezí 60 až 80 %. Doba školení závisí na podmínkách a jakosti vína. Běžné víno zraje asi jeden rok, u extraktivních a dezertních vín je to až 2 roky [5].

Vína se skladují buď v dřevěných sudech, železobetonových cisternách nebo v ocelových tancích [5, 7].

Podobně jako ovocné víno se i víno révové stáčí dvakrát [5, 7]. První stáčení oddělí víno od kvasnic, které klesly na dno nádoby [7]. První stáčení je nejdůležitější, stáčí se po dokvašení a usazení nečistot. Doba prvního stáčení je závislá také na kyselosti vína. Kyselější vína se stáčí po delší době, protože ležením vína na kvasnicích se kyselost vlivem biologického odbourání snižuje [5].

Po prvním stočení vína nastává vhodný okamžik pro konečnou úpravu kyselin ve víně – odkyselení [2].

Dokud je víno teplé, nastartuje se biologické odbourávání kyseliny jablečné (BOK). Buď se rozvine samovolně, nebo je nutné přidání vína, v němž se již BOK, jinak taky nazýváno jablečno-mléčné kvašení, rozvinulo. Případně se přidává čistá kultura speciálního kmene mléčných bakterií *Oenococcus oeni*. Rozhodně by se nemělo dlouho otálet s nastartováním BOK. Před jeho rozvinutím se totiž víno nemůže chránit oxidem siřičitým, neboť by zahubil potřebné mléčné bakterie. Biologické odbourávání kyselin se ukončuje, až když je veškerá kyselina jablečná odbourána. Jakmile mléčné bakterie rozloží veškerou kyselinu jablečnou, nastává nebezpečí, že začnou rozkládat i kyselinu citronovou za vzniku diacetylu, jehož máselné aroma není příjemné. Diacetyl vzniká i při rozkladu kyseliny jablečné a po ukončení BOK se musí víno vyvětrat, což trvá asi 2 týdny. Pak je možné celý proces ukončit přiměřeným zasiřením vína. [7].

Výsledkem biologického odbourávání kyselin je snížení kyselosti rozkladem kyseliny jablečné za vzniku chuťově jemnější kyseliny mléčné (jablečno-mléčné kvašení). Poprvé se stáčí v prosinci až lednu do čistých zasiřených nádob [5].

Jablečno-mléčné kvašení je možno aktivovat také krátkodobějším vytopením sklepa na 20 °C. Jablečno-mléčným kvašením by měla projít zejména červená vína, protože díky tomuto biologickému pochodu ztrácejí svoji tvrdost. V jižních oblastech, ale také v Kalifornii nebo Austrálii, se jablečno-mléčnému kvašení naopak zabraňuje, protože zde je kyseliny jablečné přirozeně velmi malé množství [5].

Podruhé se stáčí víno v březnu až dubnu po dokonalém vyčištění vína [5]. Silné provzdušňování vína při druhém stáčení je nežádoucí. Víno při něm ztrácí příjemnou svěží chuť a vůni. Pozměňují nebo rozkládají se při něm buketní látky a vzniká nepříjemná zvětralá chuť. Slabší provzdušnění příjemně ovlivňuje vývin červených vín tím, že se zlepšují jejich buket, barva a rychlejší usazování kalících částic [4].

Stáčení vína je možno spojit se scelováním, čiřením a filtrací [4].

Čiření vín

Po prvním a druhém stáčení se révová vína před filtrací čiří podobně jako ovocná vína taninem a želatinou nebo ferrokyanidem draselným, mladá vína i bentonitem [2, 4, 5, 7]. Čiření vína znamená přidání absorpčního materiálu do moštu nebo vína s cílem odstranit nebo snížit obsah nežádoucích látek [2, 4]. Výhodné je zbavit se kalů vína co nejdříve, aby

si zachovalo příjemnou svěžest, lahodnost a pitelnost [4]. Vína chuťově nebo vzhledově vadná se mohou čířit i dalšími způsoby. K nim patří [5]:

- číření agarem,
- číření vaječným bílkem,
- číření kaolinovými hlinkami,
- číření aktivním uhlím,
- číření mlékem.

Stabilizace vína

Stabilizací jsou omezovány biochemické procesy, při nichž dochází k vysrážení látek nacházejících se ve víně v době skladování, nalahvování a při přepravě. Většinou jde o látky koloidní povahy, které tvoří zákal vína. Stabilizovat se musí zejména proto, aby se vyrobily vína mladá, svěží a se zbytkem nezkrvašeného cukru. Stability vína by mělo být dosaženo bez porušení kvality a „odrůdového“ charakteru vína [4].

Podle povahy sraženiny jsou zákaly rozděleny na biologické a nebiologické [4, 9].

Filtrace vín

Filtrace je separační metoda, která se používá k zachycení pevných částic roztoku [2, 9]. Jejím cílem je oddělení všech pevných částic ve víně, aniž by došlo k úpravám, nebo dokonce ke změnám chemického složení vína a potažmo k negativnímu ovlivnění aromatických a chuťových vlastností vína [2]. Účinnost filtrace závisí na velikosti pórů filtrační hmoty a způsobu zachycení pevných částic [5].

Nejnověji se prozatím převážně u velkých vinařských firem používají tzv. membránové filtry, které jsou podle konstrukce a zvolené membrány použitelné od hrubé filtrace až po mikrobiální sterilaci vín Révové víno se může filtrovat několikrát, ale filtrace je nutná vždy po vyčiření, kdy se potom víno nechá zrát. Nutná je většinou také filtrace před vlastním lahvováním [5].

Ve vinařské malovýrobě lze používat následující filtrační postupy [2, 7]:

- filtrace s použitím křemeliny,
- filtrace s použitím deskových filtrů a filtračních desek,
- membránová filtrace.

1.6 Lahvování a expedice

Lahvování je dnes nejčastějším způsobem prodeje vína [7, 9].

Nelze lahvovat vína, která dokváší. Včasné nalahvování vína před jeho vrcholem vývoje zajišťuje jeho vysokou kvalitu. Proces zrání vína pokračuje v láhvi a víno se stává tzv. lahvově zralým. Každá odrůda má svůj čas vhodný k lahvování [5].

Vyškolené víno se plní do lahví, které se uzavírají korkovou zátkou nebo šroubovací zátkou z plastu. Další možností jsou korunkové zátky s korkovou podložkou [4, 5].

Před prodejem je přirozeně nezbytné nalahvované víno nějaký čas skladovat. Při lahvování utrpí víno šok a trvá několik týdnů, nežli se narušená rovnováha opět ustálí [7].

1.7 Malolaktická fermentace

Bakterie mohou odbourat v chuti ostře kyselou kyselinu jablečnou na zaoblenější kyselinu mléčnou a oxid uhličitý. Tento proces se nazývá biologické nebo bakteriální odbourávání kyselin, malolaktické kvašení nebo jablečno-mléčné kvašení. Mimo snížení obsahu kyselin je ovlivňováno i aroma vína. [6].

Jelikož je způsobováno bakteriemi, nejedná se o skutečné kvašení – fermentaci [2, 10]. Přesto se však toto označení zcela vžilo a používá se po celém světě [2].

Původně, aniž by bylo žádoucí, docházelo ke spontánnímu BOK v červených vínech chudých na kyselinu a BOK vedlo ke zkažení vína. I dnes se BOK provádí především u červených vín, protože se tam bakterie kyseliny mléčné lépe rozmnožují [8]. Je však možné využít tuto technologii i při výrobě bílých vín, což je u nás méně rozšířené [2]. V každém případě už BOK nemusí být ponecháno náhodě. Je znám dostatek chemických a mikrobiologických postupů, které je možno pro optimalizaci kvality používat [8].

Mimo zdroje energie – kyselinu jablečnou – potřebují bakterie také další živiny jako aminokyseliny, nenasycené mastné kyseliny a vitaminy. Proto nejsou vína ze stresovaných vinic a vína, která vykazovala problémy při kvašení, vhodná pro BOK [6].

Mléčné bakterie náleží k rodům *Leuconostoc*, *Lactobacillus* nebo *Pediococcus* a nacházejí se v čerstvém moštu v relativně malém počtu. Před a během alkoholového kvašení se tyto kmeny prakticky nemohou množit a téměř nejsou aktivní. Teprve při koncentraci kolem 3 až 10 milionů/ml začíná vznikat kyselina mléčná. Přitom je odbourávána nejdříve kyselina jablečná, pak citronová a nakonec ještě zbývající cukr [6].

Tento průběh se ale může zvrátit, a i když je ještě k dispozici kyselina jablečná, může vznikat nežádoucí diacetyl, který dodává vínu máselnou chuť, a při vyšší koncentraci až chuť po sýru nebo jogurtu [6].

Nejvýznamnějším kmenem bakterií pro víno je *Leuconostoc oenos*, který se nyní označuje jako *Oenococcus oeni* [6, 9].

Jablečno-mléčné kvašení může probíhat i na základě činnosti mléčných bakterií, které se vyskytují spontánně na hroznech ve vinici nebo ve vinařském provozu. Z pohledu kontroly celého technologického procesu JMK je však výhodnější inokulace čistou kulturou mléčných bakterií *Oenococcus oeni*. Použití čisté bakteriální kultury umožňuje výrobcí vína načasovat JMK a částečně ovlivnit i délku odbourávání kyseliny jablečné [2].

Pro výrobu kvalitního vína je důležité správné načasování JMK. Kvůli snadné kontrole průběhu a vlivu na kvalitu vína se doporučuje u malovinařů nechat JMK proběhnout po ukončení alkoholového kvašení. Pokud se aplikují mléčné bakterie do vína po ukončení alkoholového kvašení, tak se vyhne nadměrné produkci kyseliny octové a kyseliny D-mléčné, které mohou negativně ovlivňovat aroma a chuť vína [2].

Dalším možným způsobem aplikace mléčných bakterií je samozřejmě vzájemná inokulace čistých selektovaných kvasinek a mléčných bakterií. Při tomto kroku dochází rovněž k přeměně kyseliny L-jablečné na kyselinu L-mléčnou, při současném zachování ovocného charakteru vína. Společná inokulace umožňuje mléčným bakteriím dobře se přizpůsobit zvyšujícímu se obsahu alkoholu [2]. Je velmi důležité si uvědomit, že populaci bakterií negativně ovlivňuje přítomnost oxidu siřičitého, který ji může silně potlačovat [2, 9].

Pokud jsou vytvořeny optimální podmínky, umožní společná inokulace rychlejší průběh JMK, takže vína získávají méně „mléčného“ a „jogurtového“ charakteru a zachovávají si výraznější chuťovou a aromatickou svěžest, což je významné u bílých vín [2].

1.7.1 Chemické reakce během BOK

- Chemická stabilizace vín

Z 1 g kyseliny jablečné vzniká 0,67 g kyseliny mléčné, CO₂ a sekundární produkty látkové výměny [6, 8]. Tvorba CO₂ se ostatně rovná malému úbytku extraktu [8]. Titrovatelné kyseliny se přitom sniží o polovinu původního podílu kyseliny jablečné [6, 8].

Pozitivní účinky [8]:

- odbourávání kyseliny jablečné na harmonizující kyselinu mléčnou,
- kyselina pyrohroznová je přeměněna na kyselinu mléčnou,
- z acetaldehydu vzniká etanol.

Mimo přeměny kyseliny L-jablečné na kyselinu L-mléčnou se transformují i další zdroje vodíku, jako například fruktóza, kyselina gluonová, kyselina citronová a pyrohroznová, polyalkoholy a glyceriny. Přitom vznikají malá množství kyseliny octové, acetoinu a vyšší alkoholy [8, 9]. Z organicky vázaného dusíku se vedle různých produktů látkové výměny tvoří amoniak. Aminokyseliny se mohou v závislosti na kmeni bakterií odbourat na 24 různých biogenních aminů [8].

1.7.2 Bakterie kyseliny mléčné

- Homofermentativní bakterie

K homofermentativním bakteriím kyseliny mléčné patří kulovité (koky například *Pediococcus damnosus*) a tyčinkovité bakterie (kmeny druhů *Lactobacillus*) [8, 10]. *Pediococcus damnosus* a některé kmeny druhu laktobacilů tvoří z hexóz D-mléčnou a L-mléčnou kyselinu, ale také kyselinu octovou v malých množstvích, závislejících na kmeni [8].

- Heterofermentativní bakterie

Heterofermentativní bakterie kyseliny mléčné tvoří podstatně více kyseliny octové z glukózy a další vedlejší produkty (například etanol, acetaldehyd) [8].

K heterofermentativním bakteriím kyseliny mléčné patří vedle některých druhů laktobacilů *Oenococcus oeni* [8, 10].

1.7.3 Podmínky BOK

Na vlastní proces JMK má vliv několik faktorů [2, 6, 8]:

- Hodnota pH

Je jedním z nejdůležitějších faktorů, které ovlivňují úspěšné proběhnutí JMK [2]. Obvyklá hodnota leží mezi 3,0 - 3,6 pH [2, 6, 8]. Čím vyšší je hodnota pH moštu nebo vína, tím snadněji dochází k rozmnožování mléčných bakterií a k rychlejšímu průběhu JMK [2]. V případě nízkého pH ho můžeme upravit odkyselením, abychom dosáhli hodnot alespoň 3,3 - 3,4 pH [2, 6, 8]. Pod pH 3,0 už nedochází k vůbec žádnému rozmnožování, od pH 3,5 se rozmnožují *Pediococcus damnosus* a jiné kontaminanty [6, 8]. Malý prostor mezi pH 3,3 a pH 3,5 postačuje, aby podporoval *Oenococcus oeni* a tlumil kmeny druhu *Pediococcus* [8].

- Teplota

Teplota hraje velkou roli především ve fázi zahájení [8]. Teplotní optimum JMK leží mezi 22 - 25 °C [2, 6, 8]. Ke spontánnímu nástupu a průběhu JMK většinou nedochází při teplotách pod 10 °C [2].

Nižší teploty mají za následek zpoždění zahájení JMK, chybný průběh nebo utlumení a vznikají nečisté finální produkty. Zbytkové teplo kvašení bezprostředně po prvním stočení normálně umožňuje dostatečné rozmnožování a mělo by se využít. Pokud nejsou k dispozici teplé prostory k uskladnění vína, mohou se použít běžné metody zahřátí [8]. Nejjednodušší je použít ohřívače moštu [6, 8]. V případě potřeby ohřevu vína je vhodný infračervený ohřívač, jehož předností je, že nezpůsobuje lokální přehřátí, a tím neškodí živým bakteriím [6].

- SO₂

Snad nejvýznamnější faktor, který může ovlivňovat nástup a průběh JMK. Oxid siřičitý totiž velmi dobře eliminuje populaci všech bakterií, a tudíž i mléčných bakterií [2]. Významný je především obsah volného SO₂ [2, 6, 8]. Vázaný SO₂ má 5 - 10krát nižší antimikrobiální působení nežli volný. Slabé síření moštu většinou nemá negativní vliv na

proběhnutí JMK, protože v průběhu alkoholového kvašení se obsah volného SO₂ zpravidla sníží a většina mladých vín nemá větší obsah než 25 - 40 mg/l celkového SO₂. Aplikace oxidu siřičitého do mladého vína může naproti tomu velmi negativně ovlivňovat nástup a průběh JMK. V takovém případě může i aplikace SO₂ v množství 20 mg/l působit negativně [2]. Při koncentraci pod 10 mg/l (při pH 3,4) jsou bakterie kyseliny mléčné ještě životaschopné [6].

- Kvasniční kal a živiny

Zachování kvasničního kalu po odstranění sedimentu plní dva úkoly. Na jedné straně se bakterie kyseliny mléčné živí aminokyselinami a vitaminy, které jsou během kvašení tvořeny kvasinkami. Na druhé straně kvasinky uchovávají reduktivní okolí a zabraňují škodlivým oxidacím (například tvorba kyseliny octové) [6].

Živiny se mohou přidat i ve formě preparátů z buněčných stěn kvasinek a preparátů vitamínových [6, 9].

2 CHEMICKÉ SLOŽENÍ

Pro výrobu kvalitních vín je nutno hledat základ v chemickém složení bobulí hroznů [11]. Základem výroby je vypěstování zdravých a kvalitních hroznů. Úroveň zralosti hroznů představuje základní parametr pro výrobu kvalitního vína. Zralost hroznů je výsledkem mnoha fyziologických a biochemických procesů probíhajících v révovém keři [2].

2.1 Složení hroznů

Hrozen révy vinné je složen z třapiny a bobule [5, 6]. Pro zpracování hroznů jsou nejdůležitější hmotností poměry těchto částí hroznů, jejich technologická vyzrálost a chemické složení [5].

Třapina tvoří 3 - 4 % hmotnosti hroznů. Před dosažením optimální technologické zralosti je zelená, pak dřevnatá a hnědá [5]. Ze zelené, nevyzrálé třapiny se do moštu mohou vyluhovat třísloviny a chlorofyl, které poškozují sensorické vlastnosti vína [5, 6]. Třísloviny mohou vínu dodat nepříjemně hořkou a škrablavou chuť. Proto je třeba omezit poškození a vyluhování [6].

Bobule se skládá ze slupky, dužiny a semen. Povrch slupky je pokryt voskem [5, 6]. Podíl slupky a hmotnosti bobule může být v širokém rozmezí podle odrůdy, činí 9 - 11 % slupky z celkové hmotnosti hroznů. Jejich složení je závislé na odrůdě a má vliv na barvu, vůni, chuť a celkový odrůdový charakter vína [5]. Bobule obsahují cukry, kyseliny, třísloviny, barviva, aromatické látky, vosky, dusíkaté a minerální látky [5, 11]. Slupky bílých hroznů obsahují flavonová barviva a chlorofyl. V červených a modrých odrůdách jsou pak antokyany, u nichž poměr jednotlivých antokyanů závisí na odrůdě. Vzhledem k tomu, že antokyany jsou jen ve slupce, s výjimkou barvířek, u nichž jsou částečně i v dužnině, můžeme z modrých odrůd vyrobit i bílá nebo růžová vína. Antokyany se uvolňují z buněk slupky až po jejím umrtvení alkoholem, teplem nebo atmosférou CO₂ [5]. Hlavním antokyaninovým barvivem v bobulích je malvidin. Dále bobule obsahují delphinidin, cyanidin, petunidin, peonidin. Vyskytují se i jako estery s kyselinou octovou, kyselinou kumarovou a kyselinou kávovou [2]. Dále ve slupkách bobulí jsou koncentrovány aromatické látky, které se vyluhují krátkým kvašením po odzrnění hroznů. Ve slupkách se nachází poměrně vysoký obsah tříslovin u modrých odrůd, ale i u některých bílých [5]. Pro zdravotní stav bobulí je významná vosková vrstva na povrchu, která je chrání před

přílišným odparem vody, při deštích chrání bobule před rozmožením a konečně také před infekcí choroboplodnými mikroorganismy [5, 6]. Tenká vosková vrstva (kutikula) potahuje celou bobuli. Tato vrstva ovlivňuje také ulpívání prostředků ochrany rostlin a pohlcování pachů z okolí (např. asphalt, nafta, močůvka) [6].

Další pevnou součástí hroznů jsou semena, kterých bývá 1 - 4 v bobuli. Pokud bobule semena neobsahuje, bývá malá, tzv. hráškovitá (mirandage). Pouze některé stolní odrůdy jsou vyšlechtěny na produkci bezsemenných plodů [5].

Dužina je pro nás z hlediska zpracování i přímé spotřeby nejvýznamnější součástí. Tvoří průměrně 85 - 90 % hmotnosti bobule. Z toho 5 - 8 % tvoří sušina, zbytek mošt [5]. Velmi velké buňky dužniny (mesokarp) mají velmi slabé, málo stabilní stěny. V nich se nachází největší množství šťávy, kterou lze lehce získat [6]. Jejimi hlavními složkami jsou cukry glukóza a fruktóza, dále kyseliny vinná a jablečná [2, 5, 6]. Tyto kyseliny představují 70 - 90 % ze všech organických kyselin, jež se nacházejí v bobulích révy vinné. V malém množství se zde vyskytuje rovněž kyselina citronová. Koncentrace a složení kyselin v bobulích závisí na odrůdě a podmínkách okolního prostředí. Velký význam má hlavně oslunění hroznů, které způsobuje snižování obsahu kyseliny jablečné v bobulích. Kyselina vinná se hromadí zejména ve slupce a ve vnější části dužniny. Kyselinu jablečnou obsahují především střed dužniny a její obsah klesá směrem ke slupce [2]. Kyseliny se mohou vyskytovat jednak volné a jednak vázané převážně jako draselné a vápenaté soli [5]. V bobulích se dále nacházejí ve velmi malém množství i další cukry (rafinóza, maltóza, galaktóza, arabinóza a xylóza) [2]. Z dalších chemických látek je zde podíl dusíkatých sloučenin, pektinů, enzymů, minerálních látek a vitaminů [2, 5, 6, 11].

V hroznech se minerální látky podílejí především na tvorbě chuťových vlastností a extraktu vína [2, 9]. Jednou z hlavních minerálních látek obsažených v bobulích révy vinné je draslík. V průběhu dozrávání se koncentrace draslíku v hroznech zvyšuje ve vztahu k akumulaci hroznů. V bobuli se nalézá v buňkách dužniny. Hlavní zdroj dusíku pro kvasinky představují tzv. primární aminokyseliny a amonné ionty [2]. Celkové množství aminokyselin v bobulích závisí na mnoha faktorech okolního prostředí. V chladnějších oblastech se hromadí podstatně více aminokyselin nežli v oblastech teplých [2, 9]. Teplotu v bobulích nemálo ovlivňuje i intenzita oslunění [2].

2.2 Složení moštu

Průběh počasí, vyzrálost hroznů a samotná odrůda ovlivňují obsah různých látek v moštu. Složení moštu má vliv na kvalitu z něj získaného vína a určuje i potřebné ošetření moštu [6].

Tab. 1. Obsah jednotlivých skupin látek v bobuli a moštu v hmotnostních procentech [2]

Skupina látek	Obsah v bobuli	Obsah v moštu
Voda	74 %	76 %
Anorganické soli	0,5 %	0,4 %
Uhlohydráty (cukry)	24 %	23 %
Alkoholy	0 %	0 %
Kyseliny	0,6 %	0,7 %
Fenolické látky	0,2 %	0,01 %
Dusíkaté látky	0,2 %	0,1 %
Lipidy	0,2 %	0,01 %
Aromatické látky	0,03 %	0,02 %

2.2.1 Voda

Voda je hlavní složkou a rozpouštědlem pro všechny ostatní látky. Při přezrávání se může obsah vody podstatně snižovat v důsledku výparu [6].

2.2.2 Sacharidy

Tato skupina látek slouží v přírodě jako základní stavební kámen buněčných stěn a jako chemický akumulátor energie, proto je pro rostliny velmi důležitá [6]. Nejjednoduššími sacharidy jsou cukry, které se označují jako monosacharidy, jsou-li tvořeny pouze jedinou jednotkou, disacharidy v případě dvou jednotek a sloučeniny více monosacharidů se nazývají oligosacharidy a polysacharidy [6, 12, 13]. Pro víno jsou důležité především

hexózy (6 atomů C) a pentózy (5 atomů C), pro alkoholové kvašení pak především tři cukry - glukóza, fruktóza a sacharóza [6].

- **Glukóza** (hroznový cukr, dextróza)

V bobulích se vytváří tento monosacharid jako první [6, 7].

- **Fruktóza** (ovocný cukr)

Je to nejsladší přírodní cukr, v bobulích vzniká až později při vyzrávání [6, 7].

Glukóza a fruktóza jsou nejvýznamnějšími cukry pro alkoholové kvašení a nacházejí se v moštu jako tzv. invertní cukry ve stejném poměru (1:1) [6, 7]. Kvasinky je přeměňují na etanol a oxid uhličitý, přičemž glukóza je kvasinkami zpracovávána dříve a více (glukofilní projev kvasinek) [6, 7, 11]. Tím se mění během kvasného procesu poměr cukrů ve prospěch fruktózy [6].

I když mají glukóza a fruktóza výsledný vzorec stejný, liší se oba monosacharidy tím, že glukóza náleží k aldohexózám (aldehydové sloučeniny), kdežto fruktóza ke ketohexózám (ketonové sloučeniny) [6, 12, 13].

- **Sacharóza** (řepný cukr)

Tento disacharid je složen z molekuly glukózy a fruktózy [6, 12, 13]. Může být v malém množství (průměrně 4 g/l) obsažen v bobulích [6]. Buď vlastními kyselinami bobulí, nebo pomocí enzymu invertázy dochází k jejímu úplnému štěpení na glukózu a fruktózu [6, 12, 13]. Tato reakce se nazývá inverzí, protože optická otáčivost roviny polarizovaného světla sacharózy se mění z pozitivní výchylky na negativní. Smysl otáčení se tedy mění opačně - inverzně [6].

- **Nezkrasitelné cukry** (pentózy)

Mimo glukózy a fruktózy, které obsahují 6 atomů uhlíku, existuje i cukr s 5 atomy uhlíku. Kvasinky je nezpracovávají a musí být při analytickém stanovení cukrů vyhodnocovány samostatně (redukující cukry) [6]. Patří sem arabinóza, xylóza aj. [7]

2.2.3 Kyseliny

Stejně jako cukry vznikají asimilací v listech z vody a oxidu uhličitého. Celkové množství kyselin závisí na odrůdě, klimatických podmínkách a vyzrálости hroznů. Během vyzrávání

vzniká nejdříve kyselina jablečná a později kyselina vinná, obě tyto kyseliny jsou nejčastější. V podstatně menším množství se vyskytují ostatní kyseliny – kyselina citronová, gluonová, jantarová apod. [6].

- **Kyselina vinná**

Je nejdůležitější kyselinou v moštu a v přírodě se vyskytuje jako kyselina L(+)-vinná [6, 13, 14]. Je velmi dobře rozpustná ve vodě a alkoholu i při pokojové teplotě a v bobulích se po svém vytvoření neodbourává [6]. Spolu s chloridem draselným z kyseliny vinné vzniká špatně rozpustný hydrogenvinan draselný - vinný kámen [6, 7, 9, 13]. V důsledku jeho špatné rozpustnosti a draslíku, obsaženého v půdě, může docházet k jeho vzniku již v hroznech, zvláště při chladném počasí, čímž se může snížit obsah kyseliny vinné v moštu. Vinný kámen vzniká i při kvašení, kdy alkohol jeho rozpustnost dále snižuje [6].

V nedostatečně zasiřených vínech přechovávaných v teplejším prostředí mohou mléčné bakterie rozkládat kyselinu vinnou na kyselinu mléčnou a octovou, čímž dochází k nechtěnému zvrhnutí vína [7].

- **Kyselina jablečná**

V přírodě se vyskytuje jako kyselina L(-)-jablečná [6, 13, 14]. Je nejčastější kyselinou v řadě plodů, v bobulích hroznů révy vinné se zvyšuje její obsah během růstu bobulí až na 15 - 20 g/l. Během vyzrání se její obsah následkem dýchání trvale snižuje, zralé hrozny jí obsahují pouze 3 - 5 g/l [6].

Její úplné odbourání, při BOK, je žádoucí hlavně u červených vín [7].

2.2.4 Minerální látky (popeloviny)

Kořeny révy přijímají s vodou i minerální látky, které jsou potřeba pro výstavbu a výživu rostliny [6]. Množství těchto látek závisí na počasí, druhu půdy, hnojení, odrůdě a vyzrálosti [6, 14]. Při nedostatku vody je obsah nižší než v mokřích letech [6].

Nejdůležitějšími látkami jsou v případě kationů draslík, hořčík, vápník a sodík, v případě anionů fosforečnany, sírany, chloridy a uhličitany. V malých množstvích je rovněž obsažen bór, křemík, mangan a zinek [6].

2.2.5 Dusíkaté sloučeniny

Jde v podstatě o bílkoviny (proteiny), aminokyseliny a amonné sloučeniny. Představují látky důležité pro výživu kvasinek. Obsah dusíku postačuje většinou k tomu, aby mohlo proběhnout prokvašení. Volné aminokyseliny jako předchůdci aromatických látek (prekursory) mají význam pro vznik kvasného buketu [6].

- **Enzymy**

Jsou rovněž proteiny, katalyzují a řídí veškeré výměny u rostlin a živočichů [6].

Pektinázy štěpí polymerní strukturu pektinů, a tím snižují viskozitu moštu. To vede k lepší sedimentaci a lepší filtrovatelnosti moštu [6].

Oxidázy transportují kyslík. Především fenoloxidázy způsobují hnědnutí moštu [6].

Invertáza štěpí řepný cukr [6, 12, 13].

2.2.6 Aromatické látky

Pod tímto názvem se rozumí vonné a chuťové látky moštu a vína, které shrnuje výraz buket [6, 9]. K vonným látkám patří lehce těkavé substance jako alkoholy, estery, zatímco k chuťovým látkám špatně těkavé nebo netěkavé sloučeniny – organické kyseliny, cukr, fenolické sloučeniny [6, 7, 14]. Buketní látky z hroznů jsou náchylné na vzduch a napadení hnilobou je pozměňuje již v bobulích [6].

Rozlišuje se [6, 14]:

- primární buket - nositelem jsou látky přítomné v hroznech, resp. v moštu,
- sekundární – nositelem jsou látky vznikající v průběhu kvašení,
- terciální buket – změny během dlouhodobého zrání.

2.2.7 Polyfenoly

Polyfenoly jsou často zahrnovány pod společné označení třísloviny a barviva [6, 7]. Dříve bývaly uváděny jako oenotaniny, barviva a taninové látky [7]. Tato skupina látek obsahuje asi 8 000 sloučenin a podle způsobu reakce je lze rozdělit do pěti tříd [6]:

1. kyseliny fenolkarboxylové (deriváty kyseliny benzoové a skořicové),
2. flavonoly,

3. flavan-3-oly,
4. flavan-3,4-dioly (proantokyanidy),
5. antokyanidiny.

Polyfenoly ovlivňují barvu, hořkost, stahující pocit v chuti, jímavost kyslíku a průběh stárnutí moštu a vína [6].

Fenolkarboxylové kyseliny, označované i jako neflavonoidy, se chovají během přípravy vína jako inertní. Ostatní skupiny - flavonoidy - jsou značně reaktivní a velmi ovlivňují jímavost kyslíku, a tím i charakter vína [6].

2.3 Složení vína

Složení moštu se žádoucími i nežádoucími procesy mění [6]. K tomu patří např. enzymatická činnost, zvýšení cukernatosti, alkoholové kvašení, vysrážení vinného kamene, BOK, stabilizace, čiření mladého vína [6, 9]. Přitom se na jednu stranu snižuje množství sloučenin, nebo jsou zcela odstraňovány, a na druhou stranu vznikají během kvašení i zcela nové sloučeniny [6].

2.3.1 Voda

Podle odrůdy obsahuje víno 80 % fyziologické vody. Žádná voda se do vína již nepřidává [15].

2.3.2 Alkoholy

- **Metanol**

Vzniká odbouráváním pektinů a zvyšuje se jen intenzivním nakvácením rmutu [6, 11]. Běžný obsah metanolu se pohybuje u bílého vína mezi 17 a 100 mg/l, u červeného vína mezi 60 a 230 mg/l [6].

- **Etanol**

Po vodě je etanol s průměrnými 9 až 13 % obj. (to odpovídá 72 až 104 g/l) hlavní složkou vína [6, 15]. Je důležitým jakostním kritériem, často souvisí s obchodní hodnotou vína. Jeho zásluhou je víno plné a extraktivní a podporuje i aroma ve víně [6].

- **Vyšší alkoholy**

I když jsou ve víně zastoupeny jen v relativně malém množství (150 až 700 mg/l), mají na základě výrazného vlivu na vůni a chuť důležitou roli pro aroma vína. Často jsou nazývány „přiboudlinou“ [6].

Vyšší alkoholy opětovně vznikají z produktů vzniklých odbouráváním cukrů během kvašení. Patří proto mezi tzv. sekundární produkty kvašení a jsou důsledkem množení kvasinek. Jejich vytváření závisí na obsahu aminokyselin v moštu, které pocházejí z prokvašeného cukru, a tím přímo souvisejí s vytvářením etanolu [6].

- **2,3-butandiol**

Tato sloučenina se nachází ve víně v množství 400 až 700 mg/l a bezprostředně souvisí s obsahem etanolu. Ve sladkých vínech je jeho výskyt důkazem kvašení [6].

- **Glycerol**

Jako primární produkt kvašení dodává vínu tělo a plnost. Vzniká převážně na počátku kvašení a je vytvářen především divokými kvasinkami [6]. Je obsažen ve vínech jen v malých množstvích [11].

2.3.3 Sacharidy

Glukóza a fruktóza se během kvašení přeměňují rozdílnou rychlostí [6]. Poměr mezi glukózou a fruktózou se z poměru 1:1 v moštu během kvašení mění ve prospěch fruktózy [6, 7, 15]. Pokud je kvasný proces zastaven (u vína s přívlastkem), lze zjistit převahu fruktózy prostřednictvím změny optické otáčivosti. Přídavkem moštu se opět začíná blížit poměru 1:1 [6]. Fruktóza působí sladším dojmem, proto existují i sensorické rozdíly ve víně [6, 7].

V malých koncentracích obsahuje víno i pentózy, které jsou nezkvasitelné a jejichž obsah ovlivňuje hodnoty při analytickém stanovování cukrů zpravidla 0,5 až 1 g/l [6].

Polysacharidy jsou jako podstatná část koloidních sloučenin ve víně nežádoucí, mohou způsobovat potíže při filtraci. Na ovlivnění chuti je v současnosti rozporuplný názor [6].

2.3.4 Kyseliny

Většinu obsahu kyselin tvoří kyselina vinná a jablečná. V nevyzrálých ročnících převažuje kyselina jablečná, naopak v dobře vyzrálých ročnících převažuje kyselina vinná. Přitom se nesmí zapomenout, že různé jiné kyseliny a substance ztěžují jejich stanovení v moštu [6].

- **Kyselina vinná**

Kvasinky tuto kyselinu během kvašení nenapadají. Avšak asi 0,5 až 1,5 g/l kyseliny vinné se vysráží jako vinný kámen v důsledku obsahu alkoholu ve víně, který pozměňuje její rozpustnost [6]. Velmi vysoký obsah kyselin (přes 12 g/l) může být snížen odkyselováním, při kterém kyselina vinná vypadne pomocí uhličitanu vápenatého [2, 6, 7]. Tím zůstane ve víně více draslíku, který je jinak reakčním partnerem. To přináší na jednu stranu zakulacení a plnost vína, na druhou stranu větší nebezpečí při biologické odbourávání kyselin [6].

- **Kyselina jablečná**

Oproti kyselině vinné je jablečná kyselina lehce zpracovávána mikroorganismy. I kvasinky přeměňují během kvašení kyselinu jablečnou. Vzniká přitom alkohol, nikoliv kyselina mléčná jako při biologickém odbourávání kyselin [6].

- **Kyselina mléčná**

Větší množství kyseliny vzniká ve víně jen při bakteriální přeměně kyseliny jablečné na mléčnou [2, 6, 8, 9]. Také kvasinky mohou, i když jen v omezeném rozsahu, měnit kyselinu pyrohroznovou na mléčnou [6, 8]. Vzniklé množství je ale malé [6].

Mezi další kyseliny, které jsou obsaženy ve víně převážně v menším množství, lze zařadit kyselinu octovou, citronovou a jantarovou.

2.3.5 Minerální látky (popeloviny)

Obsah těchto látek v moštu se snižuje jejich krystalizací, vysrážením a využitím kvasinkami. Celkové množství se uvádí jako „obsah popelovin“ - zbytek po spálení organických součástí vína při 500 °C. Množství ve víně činí 1,5 až 4 g/l. V suchých letech je obsah nižší [6].

Nejvíce se na popelu podílí draslík s 650 až 950 mg/l, u červených vín může být jeho obsah ještě vyšší. Vysrážením vinného kamene při kvašení se původní obsah draslíku snižuje asi o 1000 mg/l [6].

Vápník se vyskytuje v bílých vínech v množstvích cca 60 až 80 mg/l, jeho obsah se zvyšuje při odkyselování, musí se počítat i s jeho vypadnutím (jako vinan vápenatý), mezní hodnotou je 220 mg/l [6].

2.3.6 Dusíkaté sloučeniny

Sloučeniny, obsažené v moštu (aminokyseliny, amonné soli, bílkoviny), jsou ve značném množství (až do 75 %) spotřebovávány kvasinkami [6, 15]. Při zrání vína na kvasnicích se obsah aminokyselin opět o něco zvyšuje. Celkový obsah se ve víně pohybuje mezi 250 a 4 500 mg/l [6].

2.3.7 Bílkoviny

Obsah bílkovin se značně liší, je ovlivněn odrůdou i ročníkem, v suchých letech je bílkovin více. Koncentraci bílkovin snižuje kvašení, reakce s tříslovinami (polyfenoly) a ošetření bentonitem. Termolabilní bílkoviny mohou vést v láhvi k zákalům [6].

2.3.8 Aromatické látky

Jejich obsah ve víně činí cca 0,8 až 1,2 g/l, přičemž polovinu tvoří vyšší alkoholy. Složení je velmi různorodé, doposud se rozlišuje 800 substancí. Pro odrůdový charakter vína mají velký význam terpeny, velká skupina aromatických látek. Váží se na cukr a teprve během kvašení a skladování se uvolňují a působí jako aroma [6].

2.3.9 Vitaminy

Obsah vitaminů se liší podle jednotlivých odrůd, je ovlivněn technologickým postupem výroby vína. Červená vína mají většinou vyšší obsah vitaminů než vína bílá [15]. Nejvíce jsou obsaženy vitamíny skupiny B: thiamin B₁ (červené víno ho obsahuje 7 až 10 mg/l), riboflavin B₂ (ve víně se nalézá v množství až 0,5 mg/l), kyselina pantothenová B₅ (ve víně je přítomná v množství 1,2 až 1,5 mg/l), pyridoxin B₆ (ve víně se nalézá v množství až 0,5 mg/l), kobalamin B₁₂ (ve víně je přítomný ve velmi malém množství, méně než 0,16 mg/l). Dále biotin vitamin H (víno ho obsahuje 5 mg/l), niacin vitamin PP (B₃) (ve víně je přítomen v množství 1 až 2 mg/l) [15,16]. Největší množství vitaminů B-komplexu obsahuje burčák [15].

Víno obsahuje velmi malé množství vitamínu C (kyselina askorbová), vitamín A se ve víně téměř nevyskytuje [15].

2.3.10 Polyfenoly

Polyfenoly v moštu se během nakvácení mění jen málo (viz kapitola 2.2.7). Obsah se pohybuje v bílých vínech mezi 150 až 250 mg/l, v červených až do 4 500 mg/l, podle způsobu zpracování. Během zrání a stárnutí dochází ke značným změnám, které mají vliv na chuť a barvu vína [6].

2.4 Antioxidanty

Jako antioxidanty označujeme všechny látky, přírodní i syntetické, které svou přítomností zpomalují, až potlačují nežádoucí oxidační děje [17].

Antioxidanty se rozdělují podle různých kritérií podle původu, podle mechanismu působení, podle chemického složení [12].

Podle původu na [12, 18]:

- přírodní – extrakty a směsi získané například ze zeleniny, bylin, koření, ovoce, obilovin, olejnin,
- přírodně identické – synteticky tokoferoly, askorbová kyselina,
- syntetické – BHA, BHT, galláty.

Podle struktury [12, 18]:

- fenolové - tokoferoly, fenolové antioxidanty, galláty, sloučeniny v potravinách a syntetické tokoferoly,
- endioly - kyselina askorbová, kyselina erythorbová a jejich soli a jiné deriváty,
- jiné látky - amidy, kurkuminoidy, alkaloidy rostlin, flavonoidy.

K přírodním antioxidantům se řadí [12]:

- fenoly,

- fenolové kyseliny a jejich deriváty,
- lignany,
- kurkuminoidy,
- diterpeny a chinony,
- triterpeny a steroly,
- flavonoidy,
- alkaloidy,
- sirmé peptidy a proteiny,
- ostatní (vitamíny, karotenoidy,...).

Antioxidanty jsou hojně využívány jako doplňky výživy při prevenci takových nemocí jako rakovina a srdeční onemocnění.

Ačkoliv přílišná konzumace alkoholu má nepříznivé zdravotní účinky, epidemiologická studia současně demonstrovala, že mírná spotřeba alkoholu je spojená s poklesem úmrtí na kardiovaskulární onemocnění. Výsledky studie ukazují, že lidé, kteří konzumují alkohol ve zvýšené míře, mají zvýšené riziko onemocnění srdce, zatímco lidé konzumující alkohol v malém množství mají nižší riziko onemocnění než abstinenti [19].

Výzkumy prokázaly, že po požití dvou skleniček vína denně se zvýší přísun antioxidantů až o 40 % ve srovnání s běžnou stravou [19].

2.4.1 Antioxidanty vína

Fenolické sloučeniny nebo polyfenoly jsou přírodní složky hroznů a vína [20]. Pod názvem polyfenoly jsou seskupeny hydroxybenzoové kyseliny, alkoholy, stilbeny, flavanoly, flavonoly, antokyany a trísloviny [6, 20].

Tyto sloučeniny jsou velmi důležité, protože jsou odpovědné za organoleptické vlastnosti vína, a to zejména barvu a trpkost [20]. Polyfenoly jsou také spojeny s prospěšnými účinky v souvislosti s kardiovaskulárními chorobami [19, 20, 21, 22].

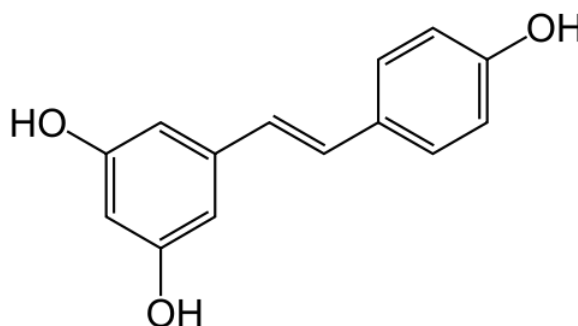
Struktura fenolové sloučeniny určuje její chemické a biologické vlastnosti. Koncentrace fenolických látek ve víně je podmíněna několika faktory (odrůda, kvalita sklizně, půdy, ovzduší, atd.) a enologickými postupy [20, 23].

Polyfenolické látky mají na lidský organismus řadu pozitivních účinků. Chovají se jako antimutageny a antioxidanty. Dále jsou schopné vytvářet chelátové komplexy s kationy kovů, působí protizánětlivě, mnohé působí proti virům a povzbuzují detoxikační enzymový systém [24].

Polyfenolické látky obsažené ve víně jsou přirozeným zdrojem antioxidantů pro lidský organismus, Je ale velmi těžké zjistit, které polyfenolické látky mají prospěšný vliv na lidské zdraví. Antioxidační účinky jednotlivých polyfenolických látek nemusí mít stejný efekt, kterého je docíleno synergickým působením různých polyfenolických sloučenin, jak je tomu například u červeného vína [25].

Mezi sloučeniny nalezenými v hroznech s výbornými zdravotními účinky patří melatonin, katechiny, lutein, kvercetin a resveratrol [26]. Ve víně byly identifikovány i další flavonoidy jako epikatechin, rutin a významnými fenolovými kyselinami rovněž s antioxidačními účinky jsou kyselina gallová, protokachetová, kumarová, kávová, vanilinová a ferulová a tento výčet není konečný [19].

- **Resveratrol**



Obr. 1. Resveratrol [27]

Resveratrol je přírodně se vyskytující fytoalexin produkovaný některými rostlinami klasifikovanými jako spermatofyty jako odpověď na biotický a abiotický stres, např. napadení patogeny, UV záření, expozice ozónem nebo mechanické poškození [28].

Patří mezi stilbeny. Objevuje se v izomerech *cis* a *trans* [19, 29, 30, 31, 32]. Přičemž *trans* forma je biologicky aktivnější [30, 31, 32].

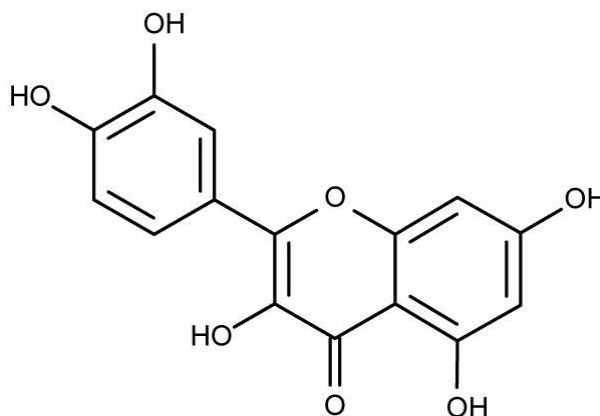
V nejvyšším množství se tato fenolová sloučenina nachází v pokožce hroznového vína [19].

Obecně platí, že vína ze severnějších zemí, kam patří i naše vinařské oblasti, mají více této sloučeniny než vína ze zemí jižních. Ve vínech z jihu Itálie bylo stanoveno průměrně pod 2 mg resveratrolu na litr. Ještě hůře dopadly v testech na resveratrol vína z Austrálie, jižní Ameriky a Kalifornie, kde byly naměřeny průměrné hodnoty tohoto antioxidantu pod 1,5 mg/l [19].

Červená vína obsahují 2 - 6 mg/l resveratrolu, tedy 1 mg je obsažen v 0,17 - 0,5 l červeného vína [31]. Červená vína obsahují asi desetkrát více resveratrolu než vína bílá. Resveratrol je produkován jako prostředek k mikrobiální ochraně, jeho výroba však může být uměle povzbuzena ultrafialovým zářením [33].

Průměrný příjem resveratrolu z běžných potravin denně je asi 200 - 600 µg. Předpokládá se, že mírná konzumace červeného vína snižuje úmrtnost na koronární onemocnění a působí pozitivně při léčení Alzheimerovy choroby [31].

- **Kvercetin**



Obr. 2. Kvercetin [41]

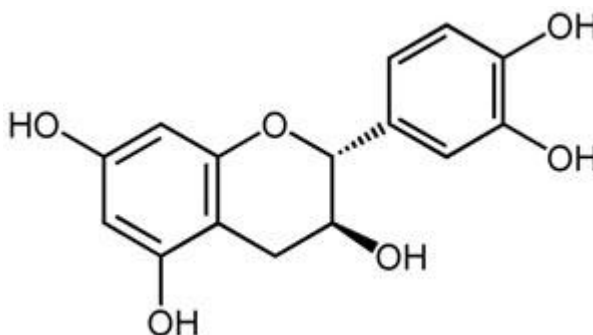
Nejvíce obsažený flavonoid ve výživě člověka je flavonol kvercetin. Nachází se ve vysokých koncentracích v běžně přijímaných potravinách jako je cibule (300 mg/kg čerstvé

váhy), jablka (21 - 72 mg/kg), kapusta (100 mg/kg), červené víno (4 - 16 mg/l) a zelený a černý čaj (10 - 25 mg/l). V takovýchto zdrojích se nachází ve formě volné i vázané s cukernými jednotkami. Např. kvercetin-3-O-glukosid (isokvercitrin), kvercetin-4'-O-glukosid (spiraeosid), kvercetin-3-O-rhamnosid (rutin) a mnoho dalších [29].

Jeho antioxidační schopnosti jsou díky jeho chemické struktuře mimořádné a je účinnějším antioxidantem než vitamíny C a E. Na druhé straně je nutno říci, že některé flavonoidy, a mezi nimi i kvercetin, vykazují nejen antioxidační aktivitu, ale v některých případech i aktivitu prooxidační [34].

Flavonoly se vyskytují v ovoci, zelenině i v nápojích, avšak v poměrně malém množství [35]. Jejich denní příjem byl odhadnut pouze na 20 mg [35, 36]. Přesto patří, především kvercetin a jeho deriváty, jako je rutin, k nejčastěji studovaným flavonoidům. Je to dáno jejich komerční dostupností a významnou biologickou aktivitou [35].

- **Katechiny**



Obr. 3. Katechin [42]

Katechiny jsou složitější fenolické látky [29]. Jejich základní složkou je 3-flavanol [13]. Patří k nim např. katechin, epikatechin, epigallokatechin a jejich estery s kyselinou gallovou. Jsou přítomné hlavně v čaji. Další zdroje jsou červené víno (270 mg/l) a čokoláda [29]. Katechiny jsou široce zastoupeny i v ovoci, zelenině a koření [37].

Flavanoly katechin a epikatechin se nacházejí ve vysokých koncentracích v zrníčkách hroznů, ale přítomny jsou i v pokožce a ve stopkách [33, 38]. Čím více je zrníček na kilogram hroznů, tím větší obsah flavanolů můžeme v červeném víně očekávat. Odrůdy hroznů s malými plody dodávají červenému vínu více polyfenolů [38].

Katechiny hrají důležitou roli v ochraně hroznů před mikroorganismy. Jsou produkovány ve vyšší míře v případě napadení révy vinné například plísněmi [33].

Po chemické stránce mají redukční a antioxidační vlastnosti, což je schopnost zneškodňovat volné radikály [29, 39].

2.4.2 Francouzský paradox

Francie patří k zemím západního životního stylu, kde se navzdory konzumaci potravin s vysokým podílem tuků a sacharidů, kouření a nedostatečného pohybu vyskytuje nejnižší úmrtnost na srdeční onemocnění. Tato skutečnost vedla k domněnce, že se jedná o paradox způsobený každodenním pitím vína spolu se stravou bohatou na vitamíny. Podobně je na tom Itálie a ostatní země s vysokou spotřebou vína [40].

3 STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY

Antioxidační aktivita je definována jako schopnost sloučeniny (směsi látek) inhibovat oxidační degradaci různých sloučenin (např. zabraňovat peroxidaci lipidů). Měly by se rozlišovat dva pojmy, a to antioxidační kapacita a reaktivita. Antioxidační kapacita poskytuje informaci o délce trvání antioxidačního účinku, reaktivita charakterizuje počáteční dynamiku průběhu antioxidačního procesu při určité koncentraci antioxidantu [43, 44].

Antioxidační účinek látek vyplývá z jejich specifické struktury. U látek fenolového typu, které jsou schopné přerušit řetězovou radikálovou reakci, závisí antioxidační schopnost na počtu a poloze hydroxylových skupin i typu dalších substituentů (alkyl, alkoxykupina, allylové uskupení, glykosidická část). Tyto strukturní faktory podmiňují snadnost odštěpení vodíku z molekuly antioxidantu, čímž se inaktivují radikály vzniklé oxidací lipidů nebo metabolickými pochody, např. hydroxylový radikál, dále ovlivňují míru stabilizace vzniklého radikálu antioxidantu, snadnost reakce s jiným radikálem či schopnost chelátovat kovy katalyzující oxidaci. Funkční skupiny v molekule antioxidantu určují též polaritu a hydrofobně-lipofilní vlastnosti molekuly, což má vliv na její rozmístění v systému. Kromě struktury ovlivňuje antioxidační aktivitu antioxidantů i pH systému a stabilita sloučenin během zpracování suroviny (teplota, fermentace) [45]. Důležitá je též přítomnost dalších látek v systému, které mohou působit jako synergisti, nebo jako antagonisti [45, 46].

V oblasti chemické analýzy a biologického hodnocení jakosti rostlinných produktů byly v posledních letech vypracovány četné metody, které umožňují stanovit tzv. celkovou antioxidační aktivitu vzorku (TAC tj. total antioxidant capacity) [43, 46, 47, 48]. TAA (total antioxidant activity) je parametrem, který kvantifikuje kapacitu vzorku biologického materiálu eliminovat radikály [46].

Jedná se o metody, které jsou principiálně značně odlišné a postupně se vyvíjejí jejich různé modifikace [43, 47]. Úkolem těchto metod je charakterizovat v podmínkách blízkých fyziologickému prostředí jejich antioxidační, případně redukční účinnost jako souhrnnou vlastnost potravin [47].

Existuje velké množství metod pro stanovení a vyjádření TAA [47, 48, 49, 50]. Jejich rozmanitost vyplývá ze skutečnosti, že nízkomolekulární antioxidanty mohou působit

různými mechanismy. Nejčastěji jde o přímou reakci s radikály (zhášení, vychytávání) nebo reakci s přechodnými kovy [47].

Jednou z nejvíce používaných je metoda TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity), která udává antioxidační aktivitu vzorku ekvivalentní definovanému množství standardu Troloxu (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina) [46, 47, 48, 49, 50]. Pro čisté látky je TEAC definována jako milimolární koncentrace Troloxu odpovídající antioxidační aktivitě testované látky o koncentraci 1 mmol/l [46, 50, 51]. Směsné vzorky se hodnotí jako látkové množství Troloxu odpovídající aktivitě 1 g či 1 ml vzorku [46, 50]. Tato metoda může být aplikována na měření čistých látek, vodných roztoků i nápojů [50].

Antioxidační aktivitu látek lze měřit metodami chemickými a fyzikálními. Chemické metody spočívají v použití činidel poskytujících s volnými kyslíkovými radikály barevné produkty, jejichž vzniku brání ve vzorku obsažené antioxidanty. Nejčastěji se využívají metody založené na eliminaci kyslíkových (ORAC) nebo syntetických stabilních (ABTS, DPPH) radikálů [50, 51]. Intenzita zbarvení se měří nejčastěji spektrofotometricky a rozdíl v hodnotách absorbancí slepého a měřeného vzorku udává obsah látek s antioxidačními účinky. Avšak srovnání výsledků poskytovaných jednotlivými metodami není snadné, protože antioxidantů i reaktivních látek, které způsobují oxidační změny, je celá řada a prakticky žádná z metod není schopna obsáhnout tento fakt v celé jeho šíři [51]. Fyzikální metody stanovení antioxidační aktivity nesledují bezprostředně chemickou reakci nebo změny obsahů jednotlivých látek, ale změnu fyzikálních vlastností, které tyto procesy doprovází. Příkladem je elektronová spinová rezonance, stanovení redoxního potenciálu či chemiluminiscence [50, 51].

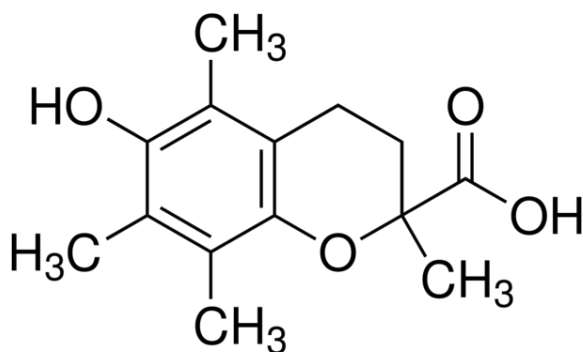
3.1 Chemické metody

3.1.1 Metoda TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity)

Metoda TEAC využívá činidel, které iniciační akcí jiné látky přecházejí na svou radikálovou formu, která je barevná a relativně stabilní. V přítomnosti antioxidačně aktivních složek extrahovaných ze vzorku potravin se redukuje, a tím odbarvuje, je měřena relativní zhášecí schopnost antioxidantu v porovnání s Troloxem. Rychlost a míra odbarvení jsou úměrné antioxidační aktivitě vzorku. Aby vyjádření této kvality vzorku

bylo standardní, stanovuje se shodným postupem TEAC v přítomnosti pouhého askorbátu, Troloxu, gallátu, epikatechinu nebo jiných klasických antioxidantů [47].

Nejčastěji používaným prekursorem radikálu je tzv. ABTS [47].



Obr. 4. Trolox [57]

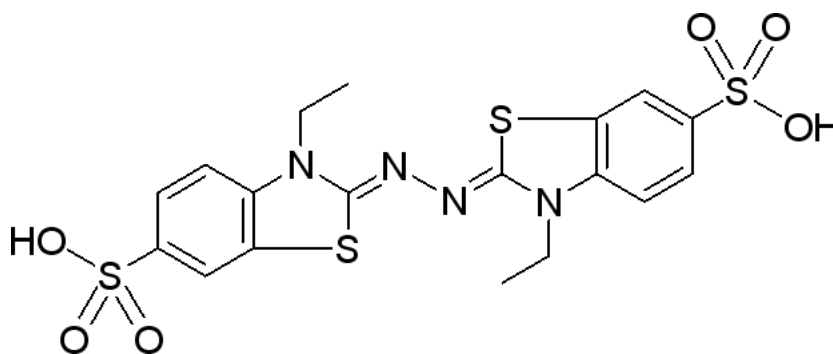
3.1.2 Metoda ABTS

Iniciátorem, který ABTS tj. 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonát) přeměňuje na modrozelený radikál $ABTS^{+\cdot}$, je látka AAPH tj. 2,2'-azo-bis(2-amidinopropan) dihydrochlorid [43, 47, 51, 52, 53]. V praxi se jako zdroj peroxidového radikálu používá AAPH, jehož směs s ABTS se inkubuje v acetátovém pufru o pH 4,3 při 45 °C po dobu 60 min. Po ochlazení a přidání vzorku, resp. pufru v případě slepého vzorku, se po 25 min měří absorbance při 734 nm. Tato tzv. hodnota TRAP (total reactive antioxidant potential) je v pivovarství považována za odpovídající indikátor antioxidantních účinků výhradně polyfenolických látek [51]. Dále lze jako iniciátor $ABTS^{+\cdot}$ použít peroxid vodíku (H_2O_2) v přítomnosti peroxidasy, hexakyanidoželeznatanu tetradraselného $K_4[Fe(CN)_6]$ či peroxidodisíranu draselného $K_2S_2O_8$ [43, 46, 47, 50].

$ABTS$ radikál ($ABTS^{+\cdot}$) je stabilní při pokojové teplotě do 35 °C a při hodnotách pH do 7,5 [54].

TEAC vyjadřuje počet radikálových kationtů $ABTS^{+\cdot}$ inaktivovaných jednou molekulou antioxidantu. Stanovení TEAC je závislé na čase inkubace jakož i na poměru množství vzorku a koncentrace $ABTS^{+\cdot}$. Jedním z omezení této metody je její malá selektivita při reakci s donory vodíkových atomů [43].

ABTS^{•+} má silnou absorpenci ve viditelné oblasti 600 - 750 nm (roztok je zelený) a antioxidační aktivita může být snadno stanovena spektrofotometricky [43, 52]. Pro spektrofotometrickou metodu stanovení celkové antioxidační aktivity s ABTS jsou popsány aplikace měření v hydrofilním i lipofilním prostředí [46].



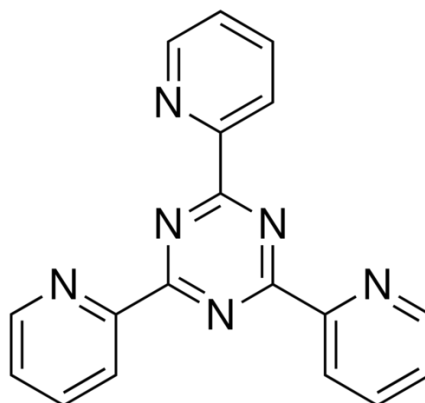
Obr. 5. ABTS [58]

3.1.3 Metoda FRAP (ferric reducing ability of plasma)

Metoda FRAP je založena na redukci železitých komplexů jako TPTZ (2,4,6-tri(2-pyridyl)-1,3,5-triazin) s hexakyanidoželezitan draselný $K_3[Fe(CN)_6]$ nebo chloridem železitým $FeCl_3$, které jsou téměř bezbarvé (popř. slabě nahnědlé) a po redukci a eventuálně reakci s dalším činidlem vytváří barevné produkty, jakým může být například berlínská modř [43, 46, 47, 50, 53]. Modře zbarvený železnatý komplex je měřitelný spektrofotometricky při vlnové délce 593 nm [43, 46].

Metoda má svá omezení spočívající v tom, že měření probíhá při velmi nízké hodnotě pH (3,6), dále nejsou zachyceny polyfenolické látky reagující s komplexem pomalu [46, 50, 55].

Metoda FRAP tak odráží pouze schopnost látek redukovat ion Fe^{3+} a s celkovou antioxidační aktivitou vzorku nemusí pozitivně korelovat [46].



Obr. 6. TPTZ [59]

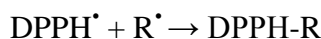
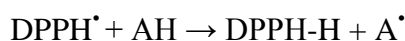
3.1.4 Metoda DPPH

Tato metoda je považována za jednu ze základních metodik pro posouzení antiradikálové aktivity čistých látek i různých směsných vzorků [46].

DPPH test je založen na schopnosti stabilního volného radikálu 2,2'-difeny-1-pikrylhydrazylu reagovat s donory vodíku [43, 51, 53, 56]. DPPH vykazuje silnou absorpci v UV/VIS spektru. DPPH test je při reakci s donory vodíku selektivnější než $\text{ABTS}^{+\cdot}$ [43].

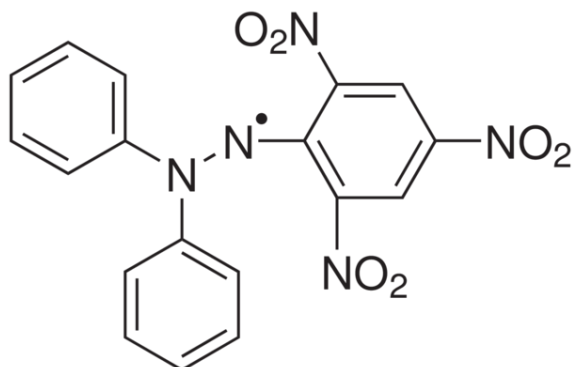
Reakce je nejčastěji sledována spektrofotometricky. Pokles absorbance při 517 nm se měří buď po uplynutí určitého konstantního času, nebo se pracuje v kinetickém režimu. Test lze provádět i na mikrotitračních destičkách. Reakci je možno sledovat i metodou elektronové spinové rezonance (ESR) nebo HPLC [46].

Při tomto testu se po redukci antioxidantem (AH) nebo radikálem (R^\cdot) roztok odbarví [43]:



Intenzivní fialové zbarvení měřitelné při 520 nm je způsobeno nepárovým elektronem na dusíku hydrazylu. Působením antioxidantů se intenzita jeho zbarvení snižuje [51]. Vzhledem k tomu, že je sledován úbytek látky, je možno použít i detekci HPLC, kdy je sledovanou veličinou plocha pásu odpovídající DPPH [46, 51].

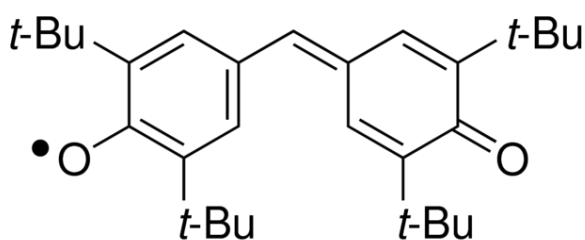
U směsných vzorků se radikálová aktivita někdy vyjadřuje v ekvivalentech askorbové kyseliny nebo v jednotkách standardu Troloxu [46].



Obr. 7. DPPH [60]

3.1.5 Metoda používající galvinoxyl

K metodám využívajícím reakci antioxidantu se stabilními radikály patří také test s galvinoxylem (2,6-di-*tert*-butyl-4-[(3,5-di-*tert*-butyl-4-oxocyklohexa-2,5-dien-1-yliden) methyl]fenoxyl). Princip metody spočívá v redukci stabilního radikálu galvinoxylu látkami poskytujícími vodík podobně jako při testu DPPH. Reakce se sleduje spektrofotometricky při vlnové délce 428 nm nebo na základě ESR [46].



Obr. 8. Galvinoxyl [61]

3.1.6 Metoda ORAC (oxygen radical absorbance capacity)

Při použití metody ORAC se v testovaném systému generují kyslíkové radikály a hodnotí se schopnost testované látky zpomalit nebo zastavit radikálovou reakci [46].

Metoda ORAC spočívá ve vytvoření peroxylového radikálu fykoerythrinu, a to jeho oxidací činidlem ABAP (2,2'-azo-bis-2-propionamidin). Radikál se určuje kvantitativně fluorimetricky a hodnotí se rychlost úbytku signálu po přidání testovaného vzorku [47].

Pro generaci peroxylových radikálů se používá AAPH, při generaci hydroxylových radikálů pak systém $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Cu}^{2+}$. Vzhledem k tomu, že tyto radikály patří k nejreaktivnějším, patří test ORAC k důležitým parametrům charakterizujícím antioxidanty [46].

3.1.7 Cyklická voltametrie

Redoxní vlastnosti látek je možno hodnotit cyklickou voltametrií, která indikuje schopnost látek odštěpovat elektrony [46].

Přítéto metodě se na pracovní elektrodu vkládá potenciálový pulz s určitou rychlostí polarizace a současně se sledují proudové odezvy v roztoku studované látky. Získaný záznam zachycuje křivka - tzv. cyklický voltamogram [46].

Redukční schopnost látek se vyhodnocuje dvěma parametry, a to z potenciálu anodického oxidačního píku E_A a jeho anodického proudu I_A . Čím je nižší hodnota E_A , tím látka snadněji odevzdává elektrony a může být lepším antioxidantem. Z hodnoty výšky proudu anodického píku I_A je možné určit koncentraci látek [46].

Cyklická voltametrie je vhodná pro získání informace, zda látka je schopna snadno odevzdávat elektrony a poté je možné zvolit určitou metodu na stanovení antioxidační kapacity. Je prokázáno, že v řadě případů hodnoty E_A korelují s antioxidační aktivitou látek určenou jinými metodami, např. DPPH [46].

3.1.8 Metoda DCI (2,6-dichlorfenolindofenolová) - metoda MEBAK

Tato metoda je standardní metodou podporovanou MEBAK (Mittleuropäische Brautechnische Analysenkommission). Principem je reakce 2,6-dichlorfenolindofenolu s endiolovou skupinou polyfenolů za vzniku bezbarvých dioxosloučenin. Tato změna zbarvení je stanovitelná spektrofotometricky. V případech, kdy není možno optických metod použít (tmavá piva, kvasnicová piva), se používá kombinace s voltametrickou detekcí. Výsledky se vyjadřují jako ekvivalenty množství kyseliny L-askorbové, která slouží jako standard [51].

3.1.9 Stanovení redukční síly 2,2'-bipyridylem

Tato metoda je založena na reakci železitých iontů s 2,2'-bipyridylem. Vzniklý komplex je silným oxidačním činidlem a reakcí se širokou skupinou redukujících látek se mění z bezbarvé oxidované formy na červenou, redukovanou. Tuto změnu lze měřit spektrofotometricky při 510 nm po třiminutové prodlevě [51].

3.1.10 Stanovení celkového antioxidačního stavu

Tato metoda byla doposud hojně využívána v medicínské praxi, zejména při stanovení antioxidačních vlastností krve a séra. Metoda spočívá v reakci methmyoglobinu s peroxidem vodíku za tvorby radikálu ferrylmyoglobinu. Uvedený radikál reaguje s ABTS v substrátu a vytváří radikál-kation $ABTS^{•+}$ modrozelené barvy. Antioxidanty v systému zabráňují tvorbě $ABTS^{•+}$ v míře odpovídající jejich koncentraci. Reakce probíhá při 37 °C, měří se při vlnové délce 600 nm [51].

3.1.11 Metoda spoluoxidace β -karotenu v linoleátovém modelovém systému

β -karoten je díky systému dvojných vazeb ve svém řetězci výborným pohlcovačem radikálů. Je přidáván do vzorku a spolu s ním podroben oxidaci. Měřitelnou veličinou je pokles absorbance β -karotenu při vlnové délce 470 nm za a bez přítomnosti antioxidantů ze vzorku. Antioxidační vlastnosti jsou vyjádřeny jako procenta inhibice oxidace β -karotenu [51].

3.1.12 Inhibice lipoxygenasové aktivity

Metoda inhibice lipoxygenasové aktivity se používá pro určení antioxidačních schopností v ječmenných a sladových extraktech. Lipoxygenasová aktivita se běžně vyjadřuje v nanomolech spotřebovaného kyslíku za sekundu (nkat). Antioxidační kapacita bývá pak vyjadřována v procentech inhibice v porovnání se srovnávacím vzorkem [51].

3.2 Fyzikální metody

3.2.1 Elektronová spinová rezonance (ESR)

Tato v poslední době velmi oblíbená metoda je schopna určit přítomnost iontů, které obsahují nepárové elektrony, a je proto vhodná pro stanovení volných kyslíkových radikálů, případně jejich komplexů s některými kovovými ionty [51].

3.2.2 Stanovení redox potenciálu

Metoda, kdy stanovujeme rH (redox potenciál vztažený ke standardní vodíkové elektrodě). Postupem času byly určeny tři skupiny látek, které rozhodující měrou ovlivňují hodnotu redox potenciálu v pivovarském procesu [51]:

- rozpuštěný kyslík (hodnota rH je lineárně závislá na jeho koncentraci),
- těžké kovy a jejich komplexy (zejména železo a měď),
- látky povahy reduktonů.

Bylo rovněž prokázáno, že měřené potenciály vyjadřují pouze okamžitý oxidačně-redukční vliv zmiňovaných látek ve vzorku, a že tedy tyto hodnoty nemohou být použity pro kvantifikaci obecných antioxidačních vlastností vzorku, neboť na něm se podílejí i další, elektrochemicky neaktivní látky. Další výzkum se proto omezil na optimalizaci používaných systémů s tím, že sledování redox potenciálů bude mít pouze informativní charakter a bude používáno jako způsob sledování obsahu rozpuštěného kyslíku [51].

3.2.3 Chemiluminiscence

Zkoumalo se použití chemiluminiscence jako metody pro stanovení intenzity oxidace lipidů. Bylo vyzkoušeno více luminiscenčních činidel, z nichž se nejvíce osvědčil 5-amino-2,3-dihydro-1,4-ftalazindion (isoluminol) a 6-fenyl-2-methyl-3,7-dihydroimidazo[1,2-a]pyrazin-3-on, což je analog luciferinu. Bylo zjištěno, že rozhodující vliv na intenzitu oxidace lipidů má jednak teplota, kdy bylo dosaženo největší intenzity luminiscence při teplotách okolo 65 °C, jednak intenzita míchání. To odpovídá podmínkám, které jsou běžné při rmutování, které bylo již dříve považováno za kritický krok z hlediska oxidace lipidových složek [51].

3.2.4 Speciální metody

Briggs-Rauscherova metoda využívá peroxylový radikál malonátu, jehož tvorba v umělém systému je moderována aplikovaným vzorkem. Kvantitativní hodnocení radikálu je oscilometrické, metoda je výjimečně citlivá [47].

Jiná metoda spočívá ve vytvoření superoxidového anionu a jeho zhášení vzorkem, koncentrace tohoto radikálu se měří pomocí specifického biosenzoru [47].

Osvědčují se rovněž metody neuvěřitelně jednoduché, např. směs měďnaté soli a činidla na sůl měďnou (bathocuproin), určuje se množství redukované formy vytvořené potravními antioxidanty [47].

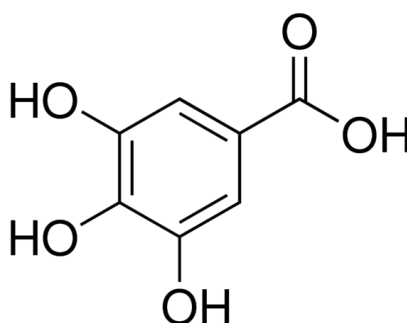
4 STANOVENÍ CELKOVÉHO OBSAHU POLYFENOLŮ

Pro stanovení celkového obsahu polyfenolů se používají tyto metody [62]:

- FCM (Folin-Ciocalteu method),
- PBM (Price and Butler method).

4.1 Metoda FCM

Tato metoda je jinak také nazývána Gallic Acid Equivalent method (GAE) [62, 63]. Jako standard slouží kyselina gallová. Činidlo neobsahuje fenol, ale obsahuje sloučeniny, které reagují s fenolickými sloučeninami. Jedná se o směs fosfomolybdenu a fosfowolframanu, která se používá pro kolorimetrické stanovení fenolických a polyfenolických antioxidantů. Folin-Ciocalteuho činidlo reaguje s fenoly a dochází k redukci látky na formu chromogenu, která může být zachyceny spektrofotometricky při 550 - 750 nm [62].

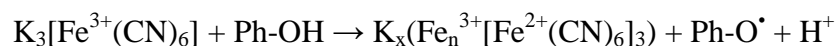


Obr. 9. Kyselina gallová [64]

4.2 Metoda PBM

V této metodě fenolátový anion oxiduje na radikál fenolátu. Současně je redukován hexakyanidoželezitanový ion a tvoří se berlínská (pruská) modř [62].

Reakce probíhá podle rovnice [62]:



5 CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo v teoretické části popsat technologii výroby révového vína, blíže se zaměřit na malolaktickou fermentaci, dále popsat chemické složení a uvést metody, kterými se antioxidační aktivita ve víně stanovuje.

Cílem diplomové práce v praktické části bylo aplikovat vybrané metody, podle nich stanovit celkový obsah polyfenolů a antioxidační aktivitu ve vzorcích vín a zjistit, jak se mění koncentrace v průběhu jablečno-mléčného kvašení.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

6 MATERIÁL A METODIKA PRÁCE

6.1 Použité chemikálie

- Folin-Ciocalteuho činidlo (1 000 ml, PENTA)
- Uhličitan sodný bezvodý (1 000 g, Lach-Ner, s.r.o.)
- Redestilovaná voda (připravena na přístroji AquaOsmotic)
- DPPH (1,5 g, Sigma-Aldrich)
- Methanol (1 000 ml, Lach-Ner, s.r.o.)
- Kyselina gallová (100 g, Sigma-Aldrich)
- Kyselina askorbová (250 g, distributor Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod)

6.2 Přístroje a pomůcky

- UV-VIS Spectrophotometer (UVmini-1240, Shimadzu)
- Analytické váhy (LABICOM s.r.o.)
- Mikrofiltry MS[®] Nylon Syringe Filter 25 mm, 0,45 μm (Chromservis s.r.o.)
- Mikropipeta 10 - 100 μl (Biohit Proline)
- Mikropipeta 100 - 1 000 μl (INTECH)
- Mikropipeta 500 - 5 000 μl (LABMATE)
- Běžné laboratorní vybavení (laboratorní sklo a pomůcky)



Obr. 10. UV-VIS Spectrophotometer [65]

6.3 Analyzovaný materiál

Analyzovaným materiálem bylo červené víno. Jednalo se o vzorky odrůdy Frankovka pocházející z vinařské oblasti Morava, Mikulovské podoblasti a vinařské obce Lednice.

Byly odebírány tři sady vzorků dané odrůdy v různých časových intervalech a při odlišných teplotách. Přičemž se lišily tím, že vzorky z van č. 3 a č. 4 byly zaočkovány Lalvin 31, jedná se o nově selektovaný kmen malolaktických bakterií vyšlechtěný ve Francii. Bakterie snižují výrazně riziko infekce a i v obtížných podmínkách se vyznačují obrovskou schopností přizpůsobení se prostředí [66]. Další sada vzorků z vany č. 5 byla zaočkována startovacím preparátem BioStart[®] Vitale SK11[®] pro přímé spuštění jablečno-mléčné fermentace v červeném a bílém víně.

Jednalo se o vína ze sběru 2008.

Datum a teplota odběru jednotlivých sad jsou uvedeny v Tab. 2. - Tab. 4.

Tab. 2. Vana č. 4

Číslo vzorku	Datum	Teplota [°C]	Poznámka
1	27. 10. 2008	10,0	
2	28. 10. 2008	12,4	
3	29. 10. 2008	13,9	
4	3. 11. 2008	21,7	
5	4. 11. 2008	29,6	Inokulace - Lalvin 31 <i>Oenococcus oeni</i> , Lallemand (Francie)
6	5. 11. 2008	28,0	
7	6. 11. 2008	25,0	
8	7. 11. 2008	24,5	
9	8. 11. 2008	23,5	
10	10. 11. 2008	22,4	
11	11. 11. 2008	21,8	

12	18. 11. 2008	18,3	
13	28. 11. 2008	14,6	
14	5. 12. 2008	13,5	
15	6. 1. 2009	12,1	
16	12. 1. 2009	14,5	
17	27. 1. 2009	15,6	
18	4. 2. 2009	14,0	

Tab. 3. Vana č. 3

Číslo vzorku	Datum	Teplota [°C]	Poznámka
19	27. 10. 2008	10,0	
20	28. 10. 2008	18,0	
21	29. 10. 2008	20,5	
22	3. 11. 2008	30,0	Inokulace - Lalvin 31 <i>Oenococcus oeni</i> , Lallemand (Francie)
23	4. 11. 2008	23,5	
25	6. 11. 2008	21,2	
26	7. 11. 2008	21,8	
27	8. 11. 2008	23,5	
28	10. 11. 2008	25,1	
29	11. 11. 2008	21,0	
32	5. 12. 2008	16,4	
33	6. 1. 2009	10,7	
34	12. 1. 2009	6,4	
35	27. 1. 2009	8,9	

36	3. 2. 2009	7,0	
----	------------	-----	--

Tab. 4. Vana č. 5

Číslo vzorku	Datum	Teplota [°C]	Poznámka
37	3. 11. 2008	21,8	
38	4. 11. 2008	31,7	Inokulace - Biostart Vitale SK11, Erbslöh
39	4. 11. 2008	29,6	
40	5. 11. 2008	31,7	
41	6. 11. 2008	30,7	
42	7. 11. 2008	29,6	
43	8. 11. 2008	26,4	
44	10. 11. 2008	23,2	
45	11. 11. 2008	21,9	
46	18. 11. 2008	14,1	
47	28. 11. 2008	13,5	
48	5. 12. 2008	13,0	
49	6. 1. 2009	11,0	
50	12. 1. 2009	9,1	
51	27. 1. 2009	12,4	
52	4. 2. 2009		

6.3.1 Úprava vzorků před stanovením

Před stanovením byly vzorky uchovávány zamrazené v tmavých neprůhledných nádobách o objemu 0,25 l. Před vlastním stanovením proběhlo jejich šetrné rozmrazení.

6.4 Metodika

Pro stanovení celkového obsahu polyfenolů v červeném víně byla vybrána metoda FCM, kdy standardy i vzorky vín byly proměřovány při vlnové délce 765 nm.

Pro stanovení antioxidační aktivity byla zvolena metoda DPPH, kdy standardy i vzorky vín byly proměřovány při 515 nm.

6.4.1 Příprava standardů

- U metody FCM byla použita jako standard kyselina gallová, která byla rozpuštěna v destilované vodě, ze zásobního roztoku o koncentraci 4 000 mg/l byla ředěním připravena kalibrační řada o koncentraci 50, 100, 200, 400, 600 a 800 mg/l. Výsledky jsou udávány v ekvivalentech kyseliny gallové (GAE - gallic acid equivalent).
- U druhé metody, pro stanovení antioxidační aktivity, byla jako standard použita kyselina askorbová. Kalibrační řada byla připravena ředěním zásobního roztoku (800 mg/l) o koncentraci 40, 80, 120, 160 a 200 mg/l. Výsledky jsou převáděny na ekvivalentní množství kyseliny askorbové (AAE - ascorbic acid equivalent).

6.4.2 Metoda FCM

Do 10 ml odměrné baňky bylo postupně napipetováno 0,1 ml vzorku, přidáno 0,5 ml Folin-Ciocalteuho činidla a 1,5 ml 20% roztoku Na_2CO_3 , který byl připraven smícháním 20 g uhličitanu sodného s 80 ml vody. Poté byla 10 ml odměrná baňka doplněna po rysku destilovanou vodou.

Jelikož byl vzorek zakalený, do kyvety se zfiltraval přes mikrofiltr. Absorbance byla změřena na spektrofotometru při vlnové délce 765 nm proti slepému vzorku, který obsahoval Folin-Ciocalteuho činidlo, 20% Na_2CO_3 a destilovanou vodu.

Celkový obsah polyfenolů byl vypočten pomocí kalibrační křivky, která byla sestrojena pro standardní roztok kyseliny gallové. Výsledná absorbance analyzovaného vzorku byla vyjádřena jako mg GAE/l, ekvivalentní množství kyseliny gallové na 1 l vzorku.

Kalibrační křivka pro metodu FCM

S přesností na 0,0001g bylo naváženo 0,4 g kyseliny gallové. Navážka byla rozpuštěna ve 100 ml destilované vody, čímž vznikl zásobní roztok o koncentraci 4 000 mg/l. Z tohoto roztoku byly připraveny kalibrační roztoky o koncentracích 50, 100, 200, 400, 600 a 800 mg/l ředěním zásobního roztoku destilovanou vodou.

Pro kalibrační křivku byl použit stejný postup jako u vzorku, kdy byly k reakční směsi přidávány místo vzorku ředěním připravené koncentrace kyseliny gallové. Následně byly proměřeny absorbance jednotlivých koncentrací při vlnové délce $\lambda = 765$ nm a byla sestrojena kalibrační křivka závislosti absorbance (%) na koncentraci kyseliny gallové (mg/l).

6.4.3 Metoda DPPH

Příprava zásobního roztoku DPPH

Na analytických vahách s přesností na 0,0001g bylo naváženo 0,024 g DPPH. Navážka byla rozpuštěna ve 100 ml metanolu.

Zásobní roztok byl uložen v mrazáku ve tmě při teplotě -18 °C.

Příprava pracovního roztoku DPPH

Ze zásobního roztoku DPPH ohřátého na laboratorní teplotu 20 °C bylo pipetou odebráno 10 ml a zředěno s 45 ml metanolu.

Absorbance vzniklé směsi byla proměřena spektrofotometricky při vlnové délce $\lambda = 515$ nm proti slepému vzorku, který tvořil metanol.

Do 10 ml odměrné baňky bylo napipetováno 450 μ l vzorku a 8,55 ml pracovního roztoku. Směs se nechala stát za nepřítomnosti světla po dobu 1 hodiny a poté byl měřen úbytek absorbance při vlnové délce $\lambda = 515$ nm. Taktéž se měřila absorbance pracovního roztoku.

Úbytek absorbance byl pomocí rovnice regrese přepočten na mg AAE/l, ekvivalentní množství kyseliny askorbové na 1 l vzorku.

Kalibrační křivka pro metodu DPPH

S přesností na 0,0001g bylo naváženo 0,08 g kyseliny askorbové, která byla rozpuštěna ve 100 ml destilované vody, čímž vznikl zásobní roztok o koncentraci 800 mg/l. Z tohoto roztoku byly připraveny kalibrační roztoky o koncentracích 40, 80, 120, 160 a 200 mg/l.

Z kalibračních roztoků bylo odebráno 450 μ l a smícháno s 8,55 ml pracovního roztoku DPPH. Nechalo se stát ve tmě 1 hodinu a pak byly změřeny absorbance jednotlivých koncentrací kyseliny askorbové při 515 nm. Následně byla sestrojena kalibrační křivka závislosti absorbance (%) na koncentraci kyseliny askorbové (mg/l).

7 VÝSLEDKY A DISKUSE

7.1 Celkový obsah polyfenolů

7.1.1 Metoda FCM

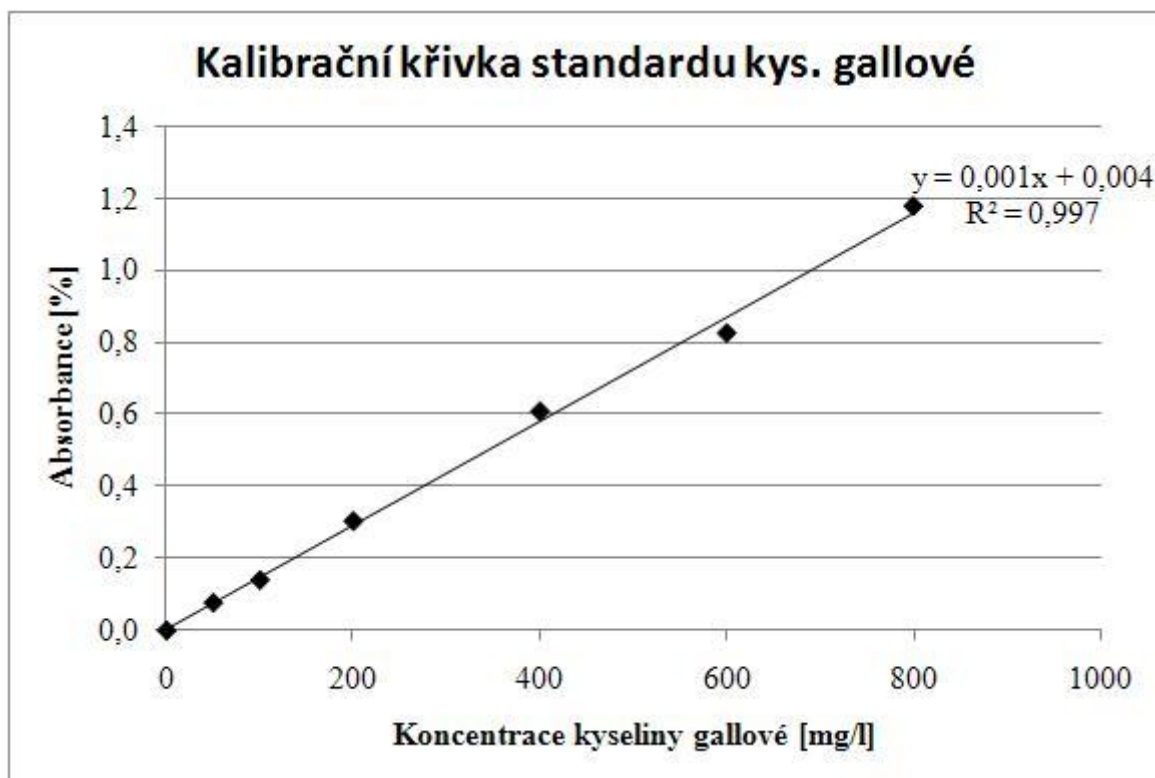
Fenoly (neselektivně mono- i polyfenoly) jsou v alkalickém prostředí oxidovány Folin-Ciocalteuho činidlem. Toto činidlo je tvořeno směsí kyseliny fosforečno-wolframové ($H_3PW_{12}O_{40}$) a kyseliny fosforečno-molybdenové ($H_3PMo_{12}O_{40}$), která se po oxidaci fenolů redukuje na směs modrých oxidů wolframu (W_8O_{23}) a molybdenu (Mo_8O_{23}).

Vytvořené modré zbarvení silně absorbuje v oblasti $\lambda = 765$ nm a je úměrné celkovému množství původně přítomných fenolových sloučenin.

Naměřené hodnoty, podle kterých byla kalibrační křivka sestrojena, jsou uvedeny v Tab. 5.

Tab. 5. Naměřené hodnoty pro kalibrační křivku standardu kyseliny gallové

Koncentrace [mg/l]	Absorbance			Průměr	Směrodatná odchylka
50	0,077	0,078	0,077	0,077	0,001
100	0,138	0,143	0,140	0,140	0,003
200	0,305	0,304	0,304	0,304	0,001
400	0,609	0,609	0,609	0,609	0,000
600	0,824	0,830	0,827	0,827	0,003
800	1,179	1,181	1,180	1,180	0,001



Obr. 11. Kalibrační křivka standardu kyseliny gallové

Bylo proměřeno celkem 48 vzorků ze tří van. Z rovnice regrese kalibrační křivky standardu kyseliny gallové byly vypočteny výsledky vyjádřené v g kyseliny gallové na 1 l vzorku vína (g GAE/l). Každý ze vzorků byl změřen 6 krát a výsledná hodnota byla zprůměrována. Výsledné průměrné hodnoty jsou uvedeny v Tab. 6. - Tab. 8. i v grafickém znázornění vývoje celkového obsahu polyfenolů na Obr. 13. - Obr. 15. v příloze P I.

Tab. 6. Výsledky koncentrací - vana č. 4

Číslo vzorku	FCM [g GAE/l]	Směrodatná odchylka
1	1,234	0,009
2	1,409	0,017
3	1,585	0,025
4	1,763	0,011
5	1,488	0,032
6	1,552	0,014

7	1,621	0,026
8	1,687	0,018
9	1,766	0,027
10	1,820	0,021
11	1,924	0,010
12	1,983	0,016
13	2,055	0,009
14	2,066	0,005
15	2,087	0,003
16	2,092	0,008
17	2,099	0,004
18	2,101	0,002

Tab. 7. Výsledky koncentrací - vana č. 3

Číslo vzorku	FCM [g GAE/l]	Směrodatná odchylka
19	1,236	0,010
20	1,418	0,015
21	1,592	0,030
22	1,303	0,005
23	1,419	0,009
25	1,600	0,018
26	1,657	0,024
27	1,724	0,015
28	1,786	0,021
29	1,862	0,030

32	2,071	0,011
33	2,093	0,009
34	2,099	0,007
35	2,105	0,003
36	2,108	0,005

Tab. 8. Výsledky koncentrací - vana č. 5

Číslo vzorku	FCM [g GAE/l]	Směrodatná odchylka
37	1,701	0,021
38	1,813	0,003
39	1,817	0,005
40	1,844	0,016
41	1,878	0,020
42	1,902	0,013
43	1,936	0,009
44	1,970	0,014
45	1,999	0,012
46	2,025	0,018
47	2,083	0,021
48	2,167	0,007
49	2,184	0,008
50	2,191	0,003
51		
52	2,202	0,006

7.2 Antioxidační aktivita

7.2.1 Metoda DPPH

Metoda spočívá v reakci testované látky s DPPH (stabilní volný radikál 1,1'-difenyl-2-pikrylhydrazyl). V metanolovém roztoku je v barevné radikálové formě DPPH[•] a vykazuje silnou absorpci v UV/VIS spektru. Redukce DPPH antioxidantem se projevuje odbarvením roztoku, které se měří spektrofotometricky při $\lambda = 515$ nm.

Antioxidační aktivita byla přepočítána jako úbytek absorbance pomocí vzorce:

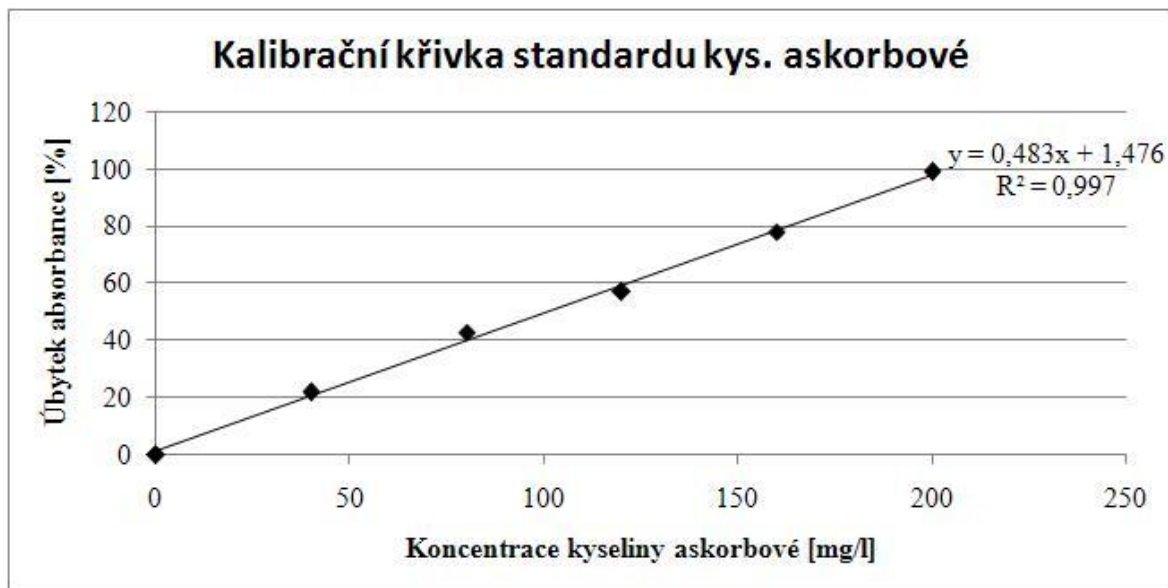
$$\text{Úbytek absorbance (\%)} = [(A_0 - A_1) / A_0] * 100,$$

kde A_0 je naměřená absorbance pracovního roztoku a A_1 absorbance směsi pracovního roztoku se vzorkem.

Naměřené hodnoty, podle kterých byl vypočten úbytek absorbance a sestrojena kalibrační křivka, jsou uvedeny v Tab. 9.

Tab. 9. Naměřené hodnoty pro kalibrační křivku standardu kyseliny askorbové

Koncentrace [mg/l]	Absorbance			Průměr	Směrodatná odchylka
40	0,079	0,078	0,077	0,078	0,001
80	0,057	0,058	0,057	0,057	0,001
120	0,043	0,044	0,041	0,043	0,002
160	0,020	0,023	0,022	0,022	0,002
200	0,000	0,001	0,001	0,001	0,001
Pracovní roztok	0,095	0,105	0,100	0,100	0,005



Obr. 12. Kalibrační křivka standardu kyseliny askorbové

Stejně jako v předchozí metodě bylo proměřeno celkem 48 vzorků ze tří van. Z rovnice regrese kalibrační křivky standardu kyseliny askorbové byly vypočteny výsledky vyjádřené v mg kyseliny askorbové na 1 l vzorku vína (mg AAE/l). Každý ze vzorků byl změřen 6 krát a ze získaných výsledků byla vypočtena průměrná hodnota i směrodatná odchylka měření. Výsledné průměrné hodnoty jsou uvedeny v Tab. 10. - Tab. 12. i v grafickém znázornění vývoje antioxidační aktivity na Obr. 16. - Obr. 18. v příloze P II.

Tab. 10. Výsledky koncentrací - vana č. 4

Číslo vzorku	DPPH [mg AAE/l]	Směrodatná odchylka
1	175,120	0,521
2	178,903	0,899
3	182,364	0,920
4	185,592	0,678
5	179,495	0,232
6	181,195	0,444
7	182,669	0,525

8	183,923	0,397
9	185,598	0,753
10	186,683	0,226
11	187,420	0,120
12	190,379	0,692
13	191,329	0,028
14	191,420	0,119
15	190,880	0,151
16	190,663	0,073
17	190,524	0,085
18	190,329	0,104

Tab. 11. Výsledky koncentrací - vana č. 3

Číslo vzorku	DPPH [mg AAE/l]	Směrodatná odchylka
19	175,228	0,515
20	179,188	0,888
21	182,776	0,902
22	177,406	0,237
23	179,273	0,854
25	183,277	0,621
26	184,319	0,366
27	185,184	0,503
28	186,505	0,819
29	187,443	0,200
32	191,217	0,478

33	191,050	0,125
34	190,665	0,066
35	190,280	0,082
36	190,101	0,091

Tab. 12. Výsledky koncentrací - vana č. 5

Číslo vzorku	DPPH [mg AAE/l]	Směrodatná odchylka
37	184,776	0,421
38	186,553	0,117
39	186,609	0,095
40	187,143	0,233
41	187,472	0,146
42	187,793	0,178
43	188,108	0,262
44	188,636	0,304
45	189,002	0,159
46	189,364	0,180
47	191,087	0,363
48	191,561	0,275
49	190,501	0,482
50	190,014	0,096
51		
52	188,996	0,077

7.3 Diskuse

V této diplomové práci byl stanoven celkový obsah polyfenolů a antioxidační aktivita červeného vína.

Pro celkové stanovení celkového obsahu polyfenolů byla použita metoda FCM. Spektrofotometricky byla měřena absorbance, jako standard byla použita kyselina gallová. Z rovnice regrese kalibrační křivky byla převedena vypočtená hodnota na ekvivalentní množství kyseliny gallové.

Výsledné průměrné hodnoty metody FCM se pohybovaly v rozsahu 1,234 - 2,101 g GAE/l u vzorků z vany č. 4, 1,236 - 2,108 g GAE/l vzorku z vany č. 3 a 1,701 - 2,202 g GAE/l u vzorků z vany č. 5. Obsah polyfenolů se pohybuje v bílých vínech mezi 150 až 250 mg/l, v červených až do 4 500 mg/l [6, 67]. Je patrné, že vzorky vína Frankovka se nachází v rozmezí těchto hodnot. Podíl těchto látek je ovlivňován technologií zpracování hroznů a školení vína. Polyfenoly jsou obsaženy ve slupkách bobulí a do vína přecházejí na začátku výrobního procesu, při nakvácení rmutu používaného u výroby červených vín [68].

Z grafu vývoje celkového obsahu polyfenolů ve vaně č. 4 a č. 3 vyplývá, že po inokulaci kulturou Lalvin 31 došlo k poklesu celkového obsahu polyfenolů. Intenzivní nárůst trval u obou vzorků vín do 11. 11. 2008 a poté mírně stoupal, až téměř stagnoval. U vzorků z vany č. 5 nebyl tento pokles zaznamenán, zřejmě kvůli inokulaci odlišnou kulturou (BioStart[®] Vitale SK11[®]) a celkový obsah polyfenolů po celou dobu rostl. Po 11. listopadu pozorujeme přibližně stejný vývoj jako u zbývajících van.

Během procesu fermentace se slupky, semena a stopky hroznů mísí se šťávou a do šťávy jsou extrahovány další fenoly. Kvašením se vyrábí etanol, který pomáhá při extrakci fenolických sloučenin ze slupek, semen a stopek. V důsledku toho dojde během fermentace ke zdvojnásobení celkového obsahu polyfenolů [69].

V práci Burnse, a kolektivu vrcholí celkový obsah polyfenolů po 6 - 7 dnech v závislosti na hroznech a výrobním procesu. Jak víno stárla, hladina celkových fenolických sloučenin postupně rostla a následně došlo ke stabilizaci, když bylo víno plněno do lahví [70].

Grafy vývoje celkového obsahu polyfenolů u jednotlivých van potvrdily přibližně stejný proces, který je popsán výše.

Pro stanovení antioxidační aktivity byla použita metoda DPPH. Jako standard byla použita kyselina askorbová. Úbytek absorbance vzorku byl přepočítán na ekvivalentní množství kyseliny askorbové v 1 litru vzorku.

Výsledné průměrné hodnoty metody DPPH se pohybovaly v rozsahu 175,120 - 191,402 mg AAE/l u vzorků z vany č. 4, 175,228 - 191,217 mg AAE/l vzorku z vany č. 3 a 184,776 - 191,561 mg AAE/l u vzorků z vany č. 5.

Z grafu vývoje antioxidační aktivity ve vaně č. 4 a č. 3 vyplývá, že po inokulaci kulturou Lalvin 31 došlo k poklesu nejen obsahu polyfenolů, ale i antioxidační aktivity. U vzorků z vany č. 5 nebyl tento pokles opět zaznamenán. Grafy kopírují průběh vývoje celkového obsahu polyfenolů s tím rozdílem, že od 5. 12. 2008 nedošlo u všech vzorků ke stagnaci, ale k úbytku antioxidační aktivity.

Metoda DPPH, kterou použil ve své práci Ginjom a kolektiv, přinesla podobný vývoj s velmi nízkou antioxidační aktivitou na začátku procesu výroby (drcení hroznů), vysokou antioxidační aktivitou během procesu kvašení a stabilní nebo mírně klesající hodnoty během období stárnutí a lahvování vína [69].

Tudíž, většinu antioxidačních změn odehrávající se v průběhu výroby vína pravděpodobně vysvětlí změny v jejich fenolickém složení. Například je zřejmé, že delší vyluhování fenolických látek ze slupek, semen a stopek hroznů během macerace a fermentace zvyšuje dramaticky antioxidační aktivitu [69].

I tato skutečnost byla grafy vývoje antioxidační aktivity u jednotlivých van potvrzena.

ZÁVĚR

V diplomové práci bylo cílem popsat vliv malolaktické fermentace na antioxidační aktivitu vína a porovnat výsledky s jinými výzkumy. V teoretické části byla popsána technologie výroby vína, chemické složení a metody stanovení celkového obsahu polyfenolů a antioxidační aktivity.

Na základě metabolické aktivity mléčných bakterií může ve víně probíhat jablečno-mléčné kvašení. Jelikož je způsobováno bakteriemi, nejedná se o skutečné kvašení – fermentaci. V důsledku činnosti mléčných bakterií nedochází pouze k přeměně kyseliny L-jablečné na kyselinu L-mléčnou, a tím i k celkovému snížení kyselosti vína, ale rovněž ke změnám v aromatickém a chuťovém projevu vína. Nejdůležitějším organismem, který zabezpečuje biologické odbourávání kyseliny jablečné, je *Oenococcus oeni*.

Jablečno-mléčné kvašení se využívá především při technologii výroby červených vín v našich klimatických podmínkách. Je však možné využít tuto technologii i při výrobě bílých vín.

Červené víno je bohatým zdrojem polyfenolických látek. Jejich obsah závisí na několika faktorech např. odrůdě, kvalitě půdy aj. Polyfenolické látky mají na lidský organismus řadu pozitivních účinků a jsou přirozeným zdrojem antioxidantů.

Jako antioxidanty jsou označovány sloučeniny, jejichž molekuly omezují aktivitu kyslíkatých radikálů a tím zabraňují nebo přerušují řetězové reakce, které byly vyvolány oxidačními procesy.

V praktické části jsou vyhodnoceny údaje o celkových polyfenolech a antioxidační aktivitě.

Pro stanovení byly k dispozici vzorky réвовých vín odrůdy Frankovka z vinařské obce Lednice. Po proběhnutí alkoholového kvašení byla vína zaočkována Lalvin 31 a BioStart® Vitale SK11® pro nastartování malolaktické fermentace. V průběhu jablečno-mléčného kvašení byly postupně odebírány vzorky vín, které se následně zamrazily. Byly uchovány při teplotě - 18 °C a poté byly šetrně rozmrazeny.

Celkový obsah polyfenolů byl stanoven metodou FCM. Průměrné hodnoty se pohybovaly v rozsahu 1,234 - 2,202 g GAE/l vzorku. Nejnižší hodnota byla naměřena u vzorků z vany č. 4, naopak nejvyšší byla zjištěna u vzorků z vany č. 5.

Pro stanovení antioxidační aktivity ve vzorcích vín byla aplikována metoda DPPH. Průměrné hodnoty u této metody se pohybovaly v rozmezí 175,120 - 191,561 mg AAE/l vzorku. Nejnižší i nejvyšší hodnota byla jako v předchozím případě naměřena u vzorků z vany č. 4, respektive z vany č. 5.

Z počátku měření po zaočkování příslušnou kulturou došlo k poklesu obsahu polyfenolických látek a následně jejich obsah neustále narůstal, s výjimkou vany č. 5, kde obsah rostl po celou dobu, až postupně došlo u všech van ke stagnaci. Stejný průběh byl zaznamenán i u antioxidační aktivity, kdy v době stagnace došlo ke snížení antioxidační aktivity jednotlivých vzorků vín.

Je tedy zřejmé, že spolu celkový obsah polyfenolů a antioxidační aktivita souvisí.

Z výsledků lze usoudit, že malolaktická fermentace má pozitivní vliv na obsah antioxidantů v červeném víně.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] VŠCHT Praha. *Tradiční technologie* [online]. ©2010 [cit. 2012-03-23]. Dostupné z: <http://www.vscht.cz/kch/kestazeni/sylaby/tradtech.pdf>
- [2] PAVLOUŠEK, Pavel. *Výroba vína u malovinařů*. 1. vyd. Praha: Grada, 2006, 96 s. ISBN 80-247-1247-4.
- [3] VŠCHT Praha. *Vinařství a výroba nealko nápojů* [online]. ©2010 [cit. 2012-03-23]. Dostupné z: <http://www.vscht.cz/kch/kestazeni/sylaby/vinarstvi.pdf>
- [4] KRAUS, Vilém, Vítězslav HUBÁČEK a Petr ACKERMANN. *Rukověť vinaře*. 3. vyd. Praha: Brázda, 2010, 267 s. ISBN 978-80-209-0378-5.
- [5] ROP, Otakar a Jan HRABĚ. *Nealkoholické a alkoholické nápoje*. 1. vyd. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2009, 129 s. ISBN 978-80-7318-748-4.
- [6] STEIDL, Robert. *Sklepní hospodářství*. V českém jazyce 2. vyd. Přeložil Jiří Sedlo. Valtice: Národní vinařské centrum, 2010, 309 s. ISBN 978-80-903201-9-2.
- [7] KRAUS, Vilém. *Nová encyklopedie českého a moravského vína*. Praha: Praga Mystica, 2008, 311 s. ISBN 978-80-86767-09-3.
- [8] EDER, Reinhard. *Vady vína*. 1. vyd. Valtice: Národní vinařské centrum, 2006, 263 s. ISBN 80-903-2016-3.
- [9] WALTON, Stuart. *Víno: obrazová encyklopedie*. 1. vyd. Praha: Svojtka, 2003, 256 s. ISBN 80-723-7439-7.
- [10] MORENO-ARRIBAS, M. a M. POLO. *Wine chemistry and biochemistry*. New York: Springer, 2009, 735 s. ISBN 978-0-387-74118-5.
- [11] KUTTELVAŠER, Zdeněk. *Abeceda vína*. 2. vyd. Praha: Radix, 2003, 279 s. ISBN 80-860-3143-8.
- [12] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin 1*. 1. vyd. Tábor: OSSIS, 1999, 328 s. ISBN 80-902-3912-9.
- [13] DAVÍDEK, Jiří, Gustav JANÍČEK a Jan POKORNÝ. *Chemie potravin*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1983, 629 s.

- [14] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin 2*. 2. vyd. Tábor: OSSIS, 2002, 331 s. ISBN 80-866-5903-8.
- [15] Víno jako lék - látkové složení vína. In: *Víno a zdraví* [online]. 2003 [cit. 2012-04-05]. Dostupné z: http://www.vinoazdravi.cz/index.php?soubor=latkove_slozeni_vina
- [16] HLÚBIK, Pavol a Libuše OPLTOVÁ. *Vitaminy*. 1. vyd. Praha: Grada, 2004, 232 s. ISBN 80-247-0373-4.
- [17] SIES, Helmut. Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*. 1997, 82(2), 291-295. ISBN 0958-0670.
- [18] HOZA, Ignác, Daniela KRAMÁŘOVÁ a Pavel BUDINSKÝ. *Potravinářská biochemie II*. 1. vyd. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2006, 104 s. ISBN 80-731-8395-1.
- [19] ŠEVČÍK, Libor. *Hledání pravdy o víně - Červená vína*. 1. vyd. Praha: Grada, 1999, 144 s. ISBN 80-716-9840-7.
- [20] GARCÍA-RUIZ, A., B. BARTOLOMÉ, A.J. MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, E. PUEYO, P.J. MARTÍN-ÁLVAREZ a M.V. MORENO-ARRIBAS. Potential of phenolic compounds for controlling lactic acid bacteria growth in wine. *Food Control*. 2008, 19(9), 835-841. ISSN 09567135.
- [21] MAGGI-CAPEYRON, Marie-France, Patrice CEBALLOS, Jean-Paul CRISTOL, Sandrine DELBOSC, Christian LE DOUCEN, Michel PONS, Claude Louis LÉGER a Bernard DESCOMPS. Wine Phenolic Antioxidants Inhibit AP-1 Transcriptional Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001, 49(11), 5646-5652. ISSN 0021-8561.
- [22] RIVERO-PÉREZ, M. Dolores, Pilar MUÑIZ a Maria L. GONZÁLEZ-SANJOSÉ. Antioxidant Profile of Red Wines Evaluated by Total Antioxidant Capacity, Scavenger Activity, and Biomarkers of Oxidative Stress Methodologies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007, 55(14), 5476-5483. ISSN 0021-8561.
- [23] MULERO, Juana, Pilar ZAFRILLA, Jose M. CAYUELA, Adela MARTÍNEZ-CACHÁ a Francisco PARDO. Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in

- Organic Red Wine Using Different Winemaking Techniques. *Journal of Food Science*. 2011, 76(3), C436-C440. ISSN 00221147.
- [24] ŠULC, Miloslav, Kateřina FAITOVÁ, Jaromír LACHMAN, Alena HEJTMÁNKOVÁ, Vladimír PIVEC a Jiří DUDJAK. Obsah celkových polyfenolických látek v hroznech vybraných odrůd révy vinné. *Vinařský obzor*. 2004, 97(9), 420-421. ISBN 1212-7884.
- [25] FAITOVÁ, Kateřina, Jaromír LACHMAN, Vladimír PIVEC, Alena HEJTMÁNKOVÁ, Jiří DUDJAK a Miloslav ŠULC. Kolísání obsahu celkových polyfenolických látek a resveratrolu v lahvích tramínu stejné šarže. In: *Česká zemědělská univerzita v Praze* [online]. 2008 [cit. 2012-04-07]. Dostupné z: http://www.vitamins.cz/archiv/2003/doc/p/P_20AC.doc
- [26] GUILFORD, J. M. a J. M. PEZZUTO. Wine and Health: A Review. *American Journal of Enology and Viticulture*. 2011, 62(4), 471-486. ISSN 00029254.
- [27] Resveratrol Chemical Structure. In: *About.com* [online]. 2012 [cit. 2012-04-07]. Dostupné z: <http://chemistry.about.com/od/factsstructures/ig/Chemical-Structures--R/Resveratrol-Chemical-Structure.htm>
- [28] KOLOUCHOVÁ, Irena, Karel MELZOCH, Jan ŠMIDRKAL a Vladimír FILIP. Obsah resveratrolu v zelenině a ovoci. *Chemické listy*. 2005, 99(7), 492-495. ISSN 0009-2770.
- [29] TRNA, Jan a Eva TÁBORSKÁ. Přírodní polyfenolové antioxidanty. In: *Masarykova univerzita* [online]. 2008 [cit. 2012-04-07]. Dostupné z: www.med.muni.cz/biochem/seminare/prirantiox.rtf
- [30] FRÉMONT, Lucie. Biological effects of resveratrol. *Life Sciences*. 2000, 66(8), 663-673. ISSN 00243205.
- [31] ŠMIDRKAL, Jan, Vladimír FILIP, Karel MELZOCH, Irena HANZLÍKOVÁ, Daniela BUCKIOVÁ a Bohdan KŘÍSA. Resveratrol. *Chemické listy*. 2001, 95(10), 602-609. ISSN 0009-2770.
- [32] LEUNG, Hau Y., Lai Hang YUNG, Guoli SHI, A.-Lien LU a Lai K. LEUNG. The red wine polyphenol resveratrol reduces polycyclic aromatic hydrocarbon-induced

- DNA damage in MCF-10A cells. *British Journal of Nutrition*. 2009, 102(10), 1462-1468. ISSN 0007-1145.
- [33] Phenolic content in wine. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2012-04-07]. Dostupné z: http://en.wikipedia.org/wiki/Phenolic_compounds_in_wine
- [34] DADÁKOVÁ, Eva, Naděžda VRCHOTOVÁ, Jan TRÍSKA a Marie KYSELÁKOVÁ. Stanovení volného a celkového kvercetinu v moravských červených vínech. *Chemické listy*. 2003, 97(7), 558-561. ISSN 0009-2770.
- [35] SLANINA, Jiří a Eva TÁBORSKÁ. Příjem, biologická dostupnost a metabolismus rostlinných polyfenolů u člověka. *Chemické listy*. 2004, 98(5), 239-245. ISSN 0009-2770.
- [36] AUGER, Cyril, Pierre-Louis TEISSEDE, Peggy GÉRAIN, Nadine LEQUEUX, Aurélie BORNET, Samuel SERISIER, Pierre BESANÇON, Bertrand CAPORICCIO, Jean-Paul CRISTOL a Jean-Max ROUANET. Dietary Wine Phenolics Catechin, Quercetin, and Resveratrol Efficiently Protect Hypercholesterolemic Hamsters against Aortic Fatty Streak Accumulation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005, 53(6), 2015-2021. ISSN 0021-8561.
- [37] CASTAIGNÈDE, Vincent, Hélène DURLIAT a Maurice COMTAT. Amperometric and Potentiometric Determination of Catechin as Model of Polyphenols in Wines. *Analytical Letters*. 2003, 36(9), 1707-1720. ISSN 0003-2719.
- [38] KUMŠTA, Michal. Víno jako zdroj biologicky hodnotných fenolických látek – katechinů (výťah). In: *ZNOVÍN ZNOJMO, a. s.* [online]. 2011 [cit. 2012-04-08]. Dostupné z: <http://www.znovin.cz/vino-jako-zdroj-biologicky-hodnotnych-hodnotnych-fenolických-latek--katechinu-vytah>
- [39] POSPÍŠIL, Jan. *Antioxidanty*. 1. vyd. Praha: Academia, 1968, 274 s.
- [40] Víno jako lék - vliv vína na lidské orgány. In: *Víno a zdraví* [online]. 2003 [cit. 2012-04-08]. Dostupné z: http://www.vinoazdravi.cz/index.php?soubor=vliv_vina_na_lidske_organy

- [41] Quercetin Chemical Structure. In: *About.com* [online]. 2012 [cit. 2012-04-08]. Dostupné z: <http://chemistry.about.com/od/factsstructures/ig/Chemical-Structures--Q/Quercetin.htm>
- [42] Zelený čaj pro zdraví. In: *Dobry čaj* [online]. 2006 [cit. 2012-04-08]. Dostupné z: <http://www.dobrycaj.cz/Article.aspx?id=3>
- [43] ŠULC, Miloslav, Jaromír LACHMAN, Karel HAMOUZ, Matyáš ORSÁK, Petr DVOŘÁK a Vendulka HORÁČKOVÁ. Výběr a zhodnocení vhodných metod pro stanovení antioxidační aktivity fialových a červených odrůd brambor. *Chemické listy*. 2007, 101(7), 584-591. ISSN 0009-2770.
- [44] ROGINSKY, V a E LISSI. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*. 2005, 92(2), 235-254. ISSN 03088146.
- [45] PARKÁNYIOVÁ, Jana, Lucie PARKÁNYIOVÁ a Jan POKORNÝ. Rostliny jako zdroje přírodních antioxidantů. In: *Vysoká škola chemicko-technologická v Praze* [online]. 2009 [cit. 2012-04-09]. Dostupné z: www.vitamins.cz/archiv/2003/doc/p/P_30C.doc
- [46] PAULOVÁ, Hana, BOCHOŘÁKOVÁ a Eva TÁBORSKÁ. Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek *in vitro*. *Chemické listy*. 2004, 98(4), 174-179. ISSN 0009-2770.
- [47] ZLOCH, Zdeněk, Jan ČELAKOVSKÝ a Anna AUJEZDSKÁ. Stanovení obsahu polyfenolů a celkové antioxidační kapacity v potravinách rostlinného původu. In: *Institut Danone* [online]. 2004 [cit. 2012-04-09]. Dostupné z: <http://www.institut-danone.cz/data/studie/pridelene-granty/2004-03.pdf>
- [48] MAREČEK, Vít a Radim CERKAL. Antioxidant activity of selected varieties of malting barley. In: *Mendelova univerzita v Brně* [online]. 2010 [cit. 2012-04-09]. Dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_291_mendelnet/mendelnet2010/articles/18_marecek_330.pdf
- [49] GLISZCZYNSKA-SWIGLO, A. Antioxidant activity of water soluble vitamins in the TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) and the FRAP (ferric reducing

- antioxidant power) assays. *Food Chemistry*. 2006, 96(1), 131-136. ISSN 03088146.
- [50] FIDLER, Martin a Lenka KOLÁŘOVÁ. Analýza antioxidantů v chmelu a pivu. *Chemické listy*. 2009, 103(3), 232-235. ISSN 0009-2770.
- [51] KARABÍN, Marcel, Pavel DOSTÁLEK a Pavel HOFTA. Přehled metod pro stanovení antioxidační aktivity v pivovarství. *Chemické listy*. 2006, 100(3), 184-189. ISSN 0009-2770.
- [52] ROP, Otakar, Tünde JURÍKOVÁ, Jiří SOCHOR, Jiří MLČEK a Daniela KRAMÁŘOVÁ. Antioxidant capacity, scavenging radical activity and selected chemical composition of native apple cultivars from central europe. *Journal of Food Quality*. 2011, 34(3), 187-194. ISSN 01469428.
- [53] OZGEN, Mustafa, R. Neil REESE, Artemio Z. TULIO, Joseph C. SCHEERENS a A. Raymond MILLER. Modified 2,2-Azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic Acid (ABTS) Method to Measure Antioxidant Capacity of Selected Small Fruits and Comparison to Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) and 2,2'-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006, 54(4), 1151-1157. ISSN 0021-8561.
- [54] CANO, Antonio, Josefa HERNÁNDEZ-RUÍZ, Francisco GARCÍA-CÁNOVAS, Manuel ACOSTA a Marino B. ARNAO. An end-point method for estimation of the total antioxidant activity in plant material. *Phytochemical analysis*. 1998, 9(4), 196-202. ISSN 1099-1565.
- [55] OU, Boxin, Dejian HUANG, Maureen HAMPSCH-WOODILL, Judith A. FLANAGAN a Elizabeth K. DEEMER. Analysis of Antioxidant Activities of Common Vegetables Employing Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assays: A Comparative Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002, 50(11), 3122-3128. ISSN 0021-8561.
- [56] LACHMAN, Jaromír, Karel HAMOUZ, Jaroslav ČEPL, Vladimír PIVEC, Miloslav ŠULC a Petr DVOŘÁK. Vliv vybraných faktorů na obsah polyfenolů a antioxidační aktivitu hlíz brambor. *Chemické listy*. 2006, 100(7), 522-527. ISSN 0009-2770.

- [57] (\pm)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid. In: *Sigma-Aldrich* [online]. 2011 [cit. 2012-04-12]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/238813?lang=en®ion=CZ>
- [58] 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid). In: *Sigma-Aldrich* [online]. 2011 [cit. 2012-04-12]. Dostupné z: http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a3219?lang=en®ion=CZ&cm_sp=Customer_Favorites_-_Detail_Page_-_Text-A3219
- [59] 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine. In: *Sigma-Aldrich* [online]. 2011 [cit. 2012-04-12]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/t1253?lang=en®ion=CZ>
- [60] 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl. In: *Sigma-Aldrich* [online]. 2011 [cit. 2012-04-12]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/d9132?lang=en®ion=CZ>
- [61] Galvinoxyl, free radical. In: *Sigma-Aldrich* [online]. 2011 [cit. 2012-04-12]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/g307?lang=en®ion=CZ>
- [62] STRATIL, Pavel, Vlastimil KUBÁŇ a Jitka FOJTOVÁ. Comparison of the phenolic content and total antioxidant activity in wines as determined by spectrophotometric methods. *Czech Journal of Food Sciences*. 2008, 26(4), 242-253. ISSN 1212-1800.
- [63] Folin–Ciocalteu reagent. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2012-04-13]. Dostupné z: http://en.wikipedia.org/wiki/Folin-Ciocalteu_reagent
- [64] Gallic acid. In: *Sigma-Aldrich* [online]. 2011 [cit. 2012-04-13]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/g7384?lang=en®ion=CZ>
- [65] UV mini-1240, Standard Applications with each UV Mini Spectrophotometer. In: *Shimadzu* [online]. 2010 [cit. 2012-04-15]. Dostupné z: http://www.shimadzu.ch/images/uv/BioSpec-mini27_large.jpg
- [66] LALVIN 31 MBR[®]. In: *ZAN-AROMI spol. s r.o.* [online]. 2004 [cit. 2012-04-15]. Dostupné z: <http://vino.eshop12.cz/kategorie/21-lalvin-31-mbr>

- [67] DE BEER, D., E. JOUBERT, W.C.A. GELDERBLOM a M. MANLEY. Phenolic Compounds: A Review of their possible role as *In Vivo* Antioxidants of Wine. *South African Society for Enology & Viticulture*. 2002, 23(2), 48-61. ISSN 0253-939X.
- [68] Vliv podle druhu vína. In: *Vino a zdraví* [online]. 2003 [cit. 2012-04-22]. Dostupné z: http://www.vinoazdravi.cz/index.php?soubor=vliv_podle_druhu_vina
- [69] GINJOM, Irine R., Bruce R. D'ARCY, Nola A. CAFFIN a Michael J. GIDLEY. Phenolic Contents and Antioxidant Activities of Major Australian Red Wines throughout the Winemaking Process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010, 58(18), 10133-10142. ISSN 0021-8561.
- [70] BURNS, Jennifer, Peter T. GARDNER, David MATTHEWS, Garry G. DUTHIE, J. LEAN a Alan CROZIER. Extraction of Phenolics and Changes in Antioxidant Activity of Red Wines during Vinification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001, 49(12), 5797-5808. ISSN 0021-8561.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

BOK	Biologické odbourávání kyselin
JMK	Jablečno-mléčné kvašení
TAA	Celková antioxidační aktivita
TEAC	Trolox equivalent antioxidant capacity
TRAP	Total reactive antioxidant potential
FRAP	Ferric reducing ability of plasma
UV	Ultrafialové spektrum
VIS	Viditelné spektrum
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
ORAC	Oxygen radical absorbance capacity
MEBAK	Mitteleuropäische Brautechnische Analysenkommission
ESR	Elektronová spinová rezonance
rH	Redox potenciál
FCM	Folin-Ciocalteu method
PBM	Price and Butler method
GAE	Gallic acid equivalent
AAE	Ascorbic acid equivalent
cca	Přibližně

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1. Resveratrol</i>	39
<i>Obr. 2. Kvercetin</i>	40
<i>Obr. 3. Katechin</i>	41
<i>Obr. 4. Trolox</i>	45
<i>Obr. 5. ABTS</i>	46
<i>Obr. 6. TPTZ</i>	47
<i>Obr. 7. DPPH</i>	48
<i>Obr. 8. Galvinoxyl</i>	48
<i>Obr. 9. Kyselina gallová</i>	53
<i>Obr. 10. UV-VIS Spectrophotometer</i>	56
<i>Obr. 11. Kalibrační křivka standardu kyseliny gallové</i>	64
<i>Obr. 12. Kalibrační křivka standardu kyseliny askorbové</i>	68
<i>Obr. 13. Graf vývoje celkového obsahu polyfenolů ve vaně č. 4</i>	87
<i>Obr. 14. Graf vývoje celkového obsahu polyfenolů ve vaně č. 3</i>	88
<i>Obr. 15. Graf vývoje celkového obsahu polyfenolů ve vaně č. 5</i>	89
<i>Obr. 16. Graf vývoje antioxidační aktivity ve vaně č. 4</i>	90
<i>Obr. 17. Graf vývoje antioxidační aktivity ve vaně č. 3</i>	91
<i>Obr. 18. Graf vývoje antioxidační aktivity ve vaně č. 5</i>	92

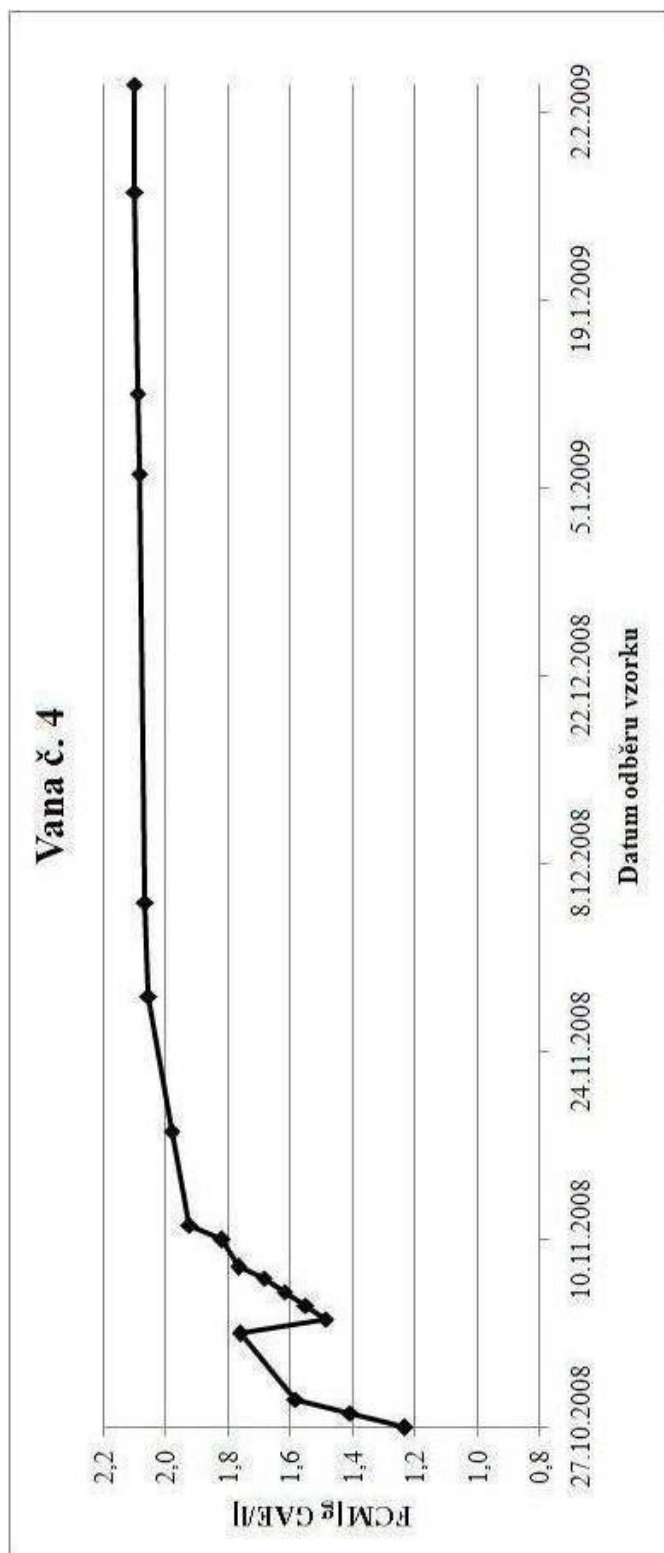
SEZNAM TABULEK

<i>Tab. 1. Obsah jednotlivých skupin látek v bobuli a moštu v hmotnostních procentech</i>	29
<i>Tab. 2. Vana č. 4</i>	57
<i>Tab. 3. Vana č. 3</i>	58
<i>Tab. 4. Vana č. 5</i>	59
<i>Tab. 5. Naměřené hodnoty pro kalibrační křivku standardu kyseliny gallové</i>	63
<i>Tab. 6. Výsledky koncentrací - vana č. 4</i>	64
<i>Tab. 7. Výsledky koncentrací - vana č. 3</i>	65
<i>Tab. 8. Výsledky koncentrací - vana č. 5</i>	66
<i>Tab. 9. Naměřené hodnoty pro kalibrační křivku standardu kyseliny askorbové</i>	67
<i>Tab. 10. Výsledky koncentrací - vana č. 4</i>	68
<i>Tab. 11. Výsledky koncentrací - vana č. 3</i>	69
<i>Tab. 12. Výsledky koncentrací - vana č. 5</i>	70

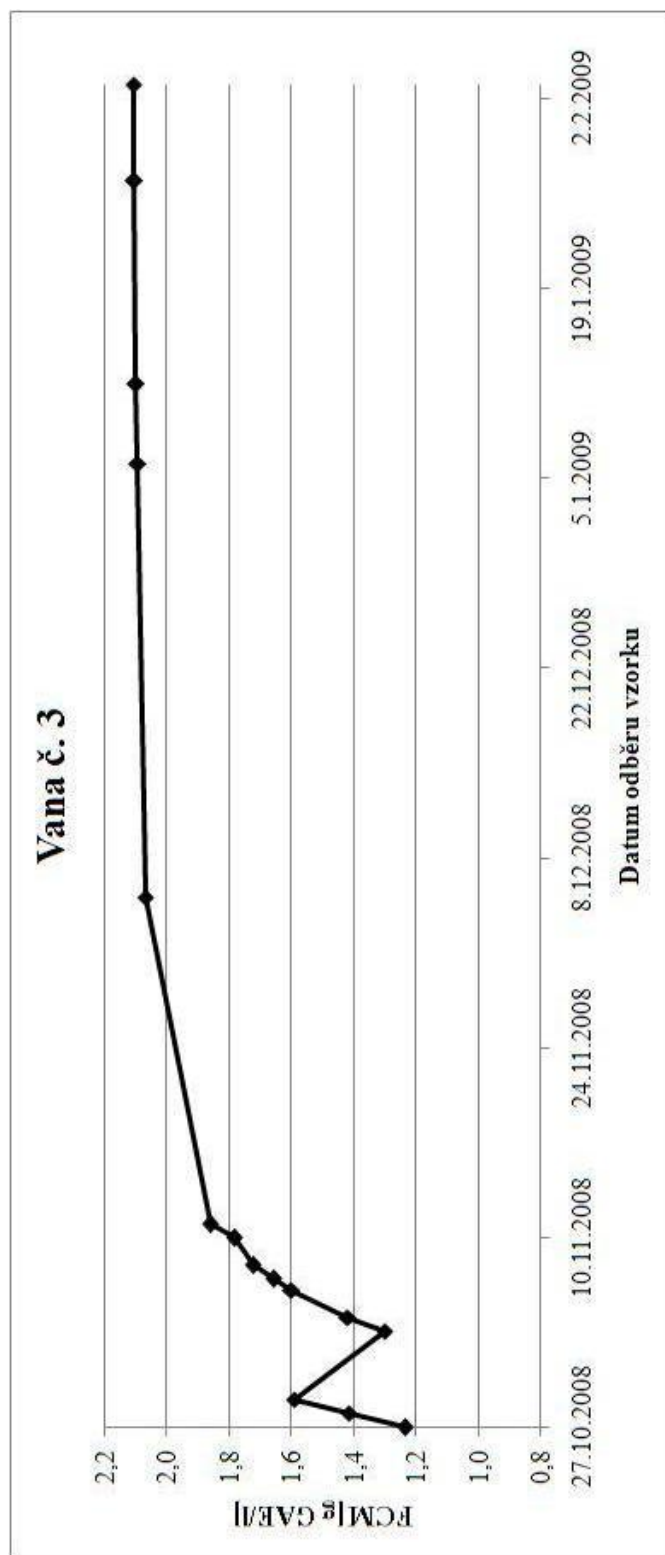
SEZNAM PŘÍLOH

- P I Celkový obsah polyfenolů
- P II Antioxidační aktivita

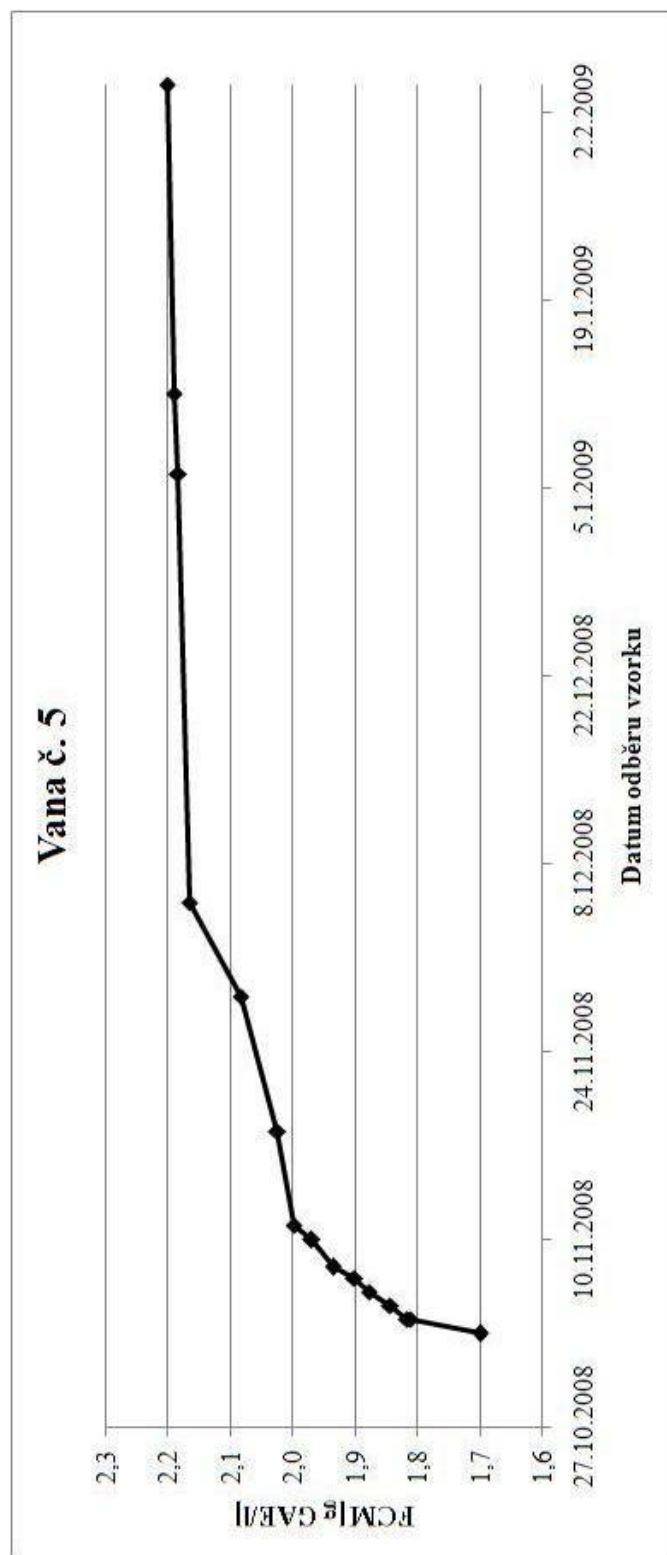
PŘÍLOHA P I: CELKOVÝ OBSAH POLYFENOLŮ



Obr. 13. Graf vývoje celkového obsahu polyfenolů ve vaně č. 4

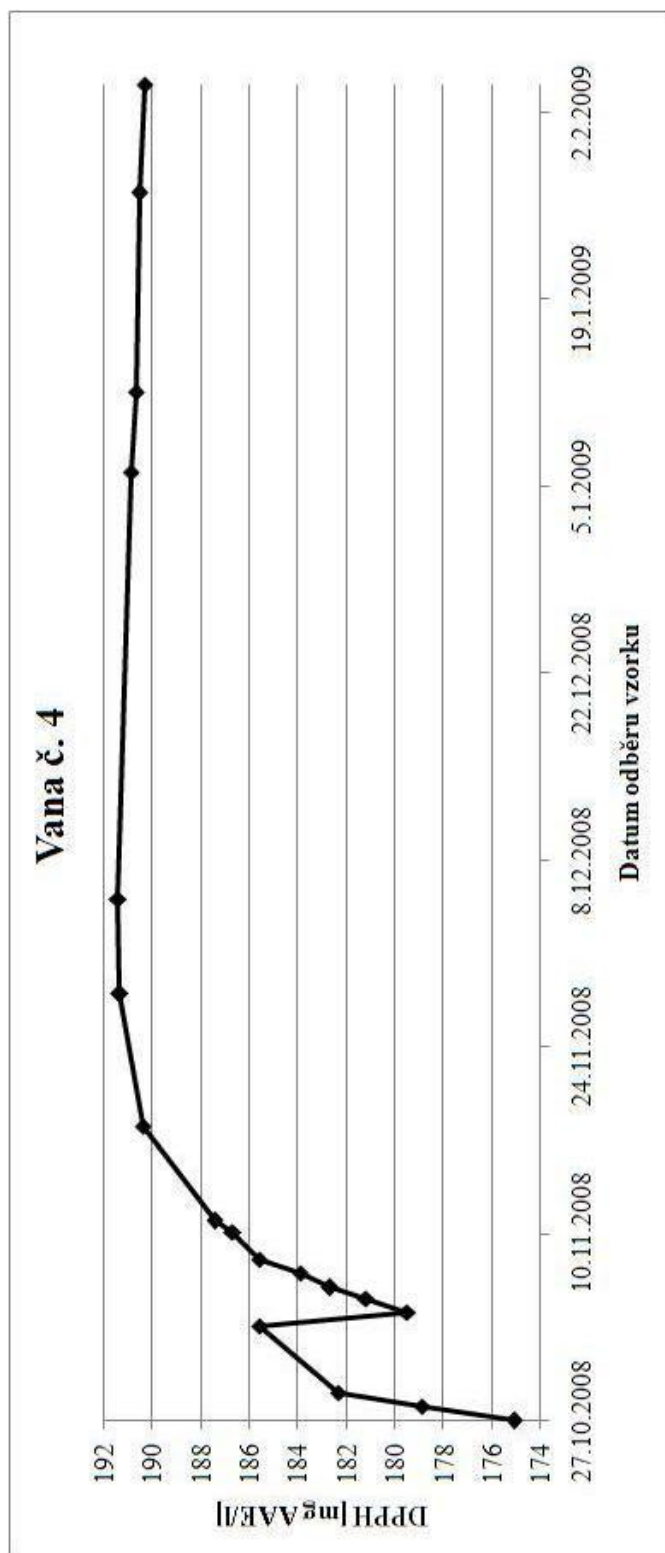


Obr. 14. Graf vývoje celkového obsahu polyfenolů ve vaně č. 3

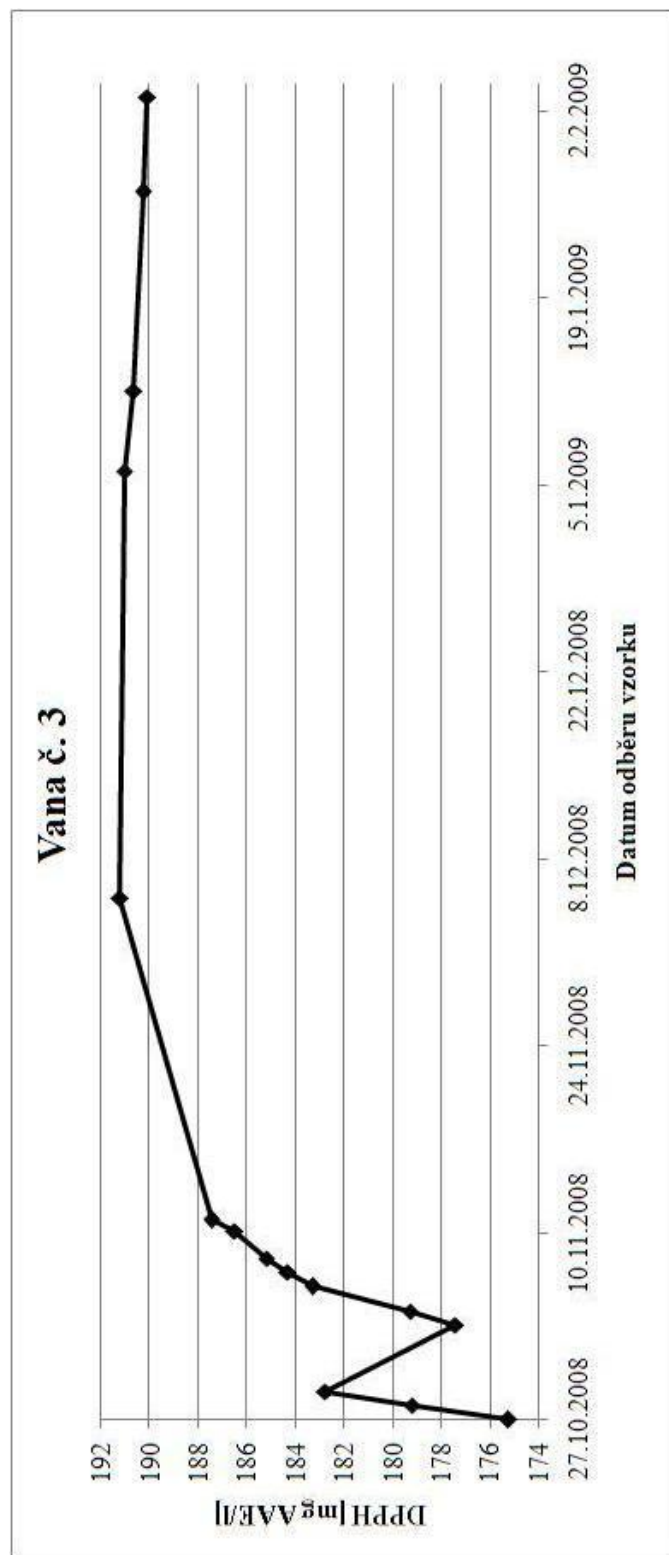


Obr. 15. Graf vývoje celkového obsahu polyfenolů ve vaně č. 5

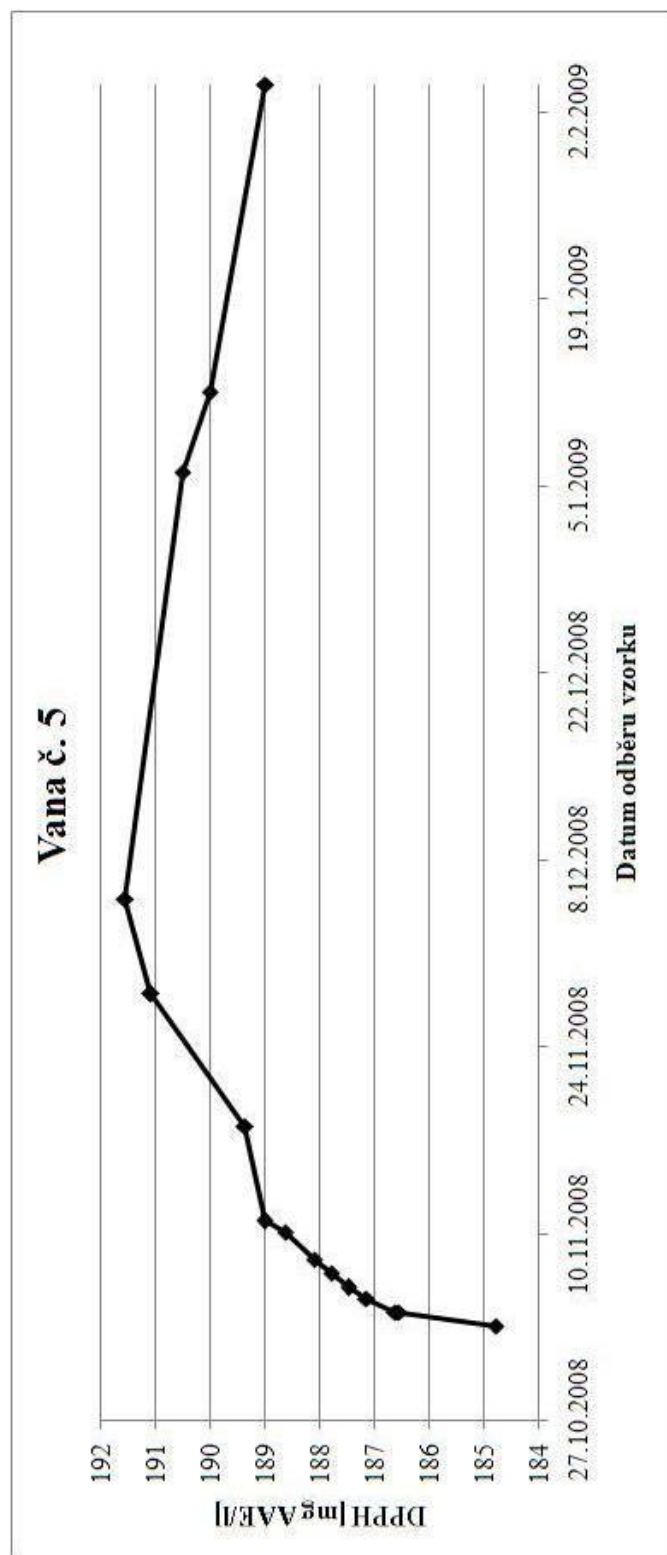
PŘÍLOHA P II: ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITA



Obr. 16. Graf vývoje antioxidační aktivity ve vaně č. 4



Obr. 17. Graf vývoje antioxidační aktivity ve vaně č. 3



Obr. 18. Graf vývoje antioxidační aktivity ve vaně č. 5